

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



*"Control de la expresión de
coactivadores involucrados en
tumorigénesis"*

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES MÉDICAS "ALFREDO LANARI"
IDIM-CONICET



Autor: Lic. Cecilia V. Alvarado

Director de tesis: Dra. Mónica A. Costas

Consejero de estudios: Dr. Carlos Davio

2014

...a mis hijas
Penélope y Malena

“Sólo dos legados duraderos podemos dejar a nuestros hijos: uno, raíces; otro, alas”

Hodding Carter (1907-1972)

Periodista y autor estadounidense.

RESUMEN

RESUMEN

RAC3 es un coactivador de la transcripción de ciertos factores y receptores nucleares que colabora en la actividad biológica de estas moléculas facilitando la expresión génica. Originalmente fue descrito como específico de receptores de hormonas esteroideas, con actividad acetilasa de histonas y la capacidad de remodelar la cromatina facilitando la expresión de genes blanco de estas hormonas. Se lo encontró sobre-expresado en tumores dependientes de las mismas y por esta razón se lo asoció a tumorigénesis hormono-dependiente. Sin embargo, años más tarde, nuestro grupo y otros investigadores hemos demostrado que RAC3 es un coactivador para otros factores de transcripción y tiene además otras funciones a nivel citoplasmático por las cuales contribuye al desarrollo tumoral de una gran variedad de tumores dependientes o no de hormonas, por lo cual hoy día se define como un oncogén.

Hemos demostrado previamente que RAC3 es un coactivador de NF- κ B, aumentando su actividad transcripcional, así como la expresión de algunos de sus genes blanco. Muchos de estos genes están vinculados a la respuesta inflamatoria, así como al control de ciclo celular, proliferación, expresión de moléculas de adhesión y otros responsables de la supervivencia celular, todos ellos a su vez relacionados con el proceso de tumorigénesis. Estos hallazgos motivaron la búsqueda de niveles elevados de RAC3 en otros tumores no específicamente respondedores a hormonas esteroideas y hoy día se sabe de su alto título en una gran variedad de tumores como el de hígado, páncreas, estómago y la lista crece.

También demostramos que su sobre-expresión contribuye al desarrollo tumoral inhibiendo la apoptosis inducida por vía de membrana y mitocondrial, en células tumorales y no tumorales. Su acción protectora de la supervivencia se debía no solo a su actividad remodeladora de la cromatina aumentando la

expresión de genes anti-apoptóticos, sino también a acciones citoplasmáticas como la regulación de actividad de kinasas y el transporte de moléculas como AIF desde la mitocondria hasta el núcleo celular, demorando su ingreso a núcleo por asociación con la maquinaria motora de citoesqueleto.

A diferencia de otros oncogenes conocidos, en el caso de RAC3, su rol oncogénico no depende de la expresión de variantes por mutación, sino que, la sola sobre-expresión es suficiente. Consecuentemente, su expresión en células normales, no tumorales, es limitante y en ocasiones indetectable por técnicas habituales de determinación de proteínas. Sin embargo, sus altos niveles de expresión en tumores, en la mayoría de los casos no se debe a amplificación génica y los mecanismos que controlan su expresión aún no han sido esclarecidos.

En este trabajo de tesis, se investigaron los posibles mecanismos responsables del aumento en los niveles de expresión de RAC3. Demostramos que la respuesta inflamatoria inducida por administración de LPS *in vivo* en ratones produce el aumento en los niveles de RAC3 en bazo y que esto ocurre a nivel transcripcional, lo cual, además y como era esperado, fue antagonizado por glucocorticoides, dada su conocida acción anti-inflamatoria. Resultados similares fueron obtenidos *in vitro* por tratamiento de la línea celular HEK293 con TNF (una de las citoquinas inflamatorias inducidas por LPS *in vivo*). Se realizó una búsqueda de posibles secuencias regulatorias de la expresión génica de RAC3 en su promotor y encontramos sitios de unión para NF- κ B, pero no para GR. Clonamos un fragmento de promotor conteniendo estas secuencias y por ingeniería genética diseñamos un plásmido en el que el promotor de RAC3 fue subclonado río arriba del gen reportero de Luciferasa. A través de estudios *in vitro*, por ensayos reporteros en células transfectadas con esta construcción, demostramos que TNF o una sobre-expresión de Rel-A (uno de los componentes del dímero de NF- κ B) activa el promotor de RAC3. Por ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina, confirmamos que los sitios de unión para NF- κ B en el promotor de RAC3 son funcionales y que, efectivamente, la activación de

la expresión génica de RAC3 inducida por la respuesta inflamatoria ocurre a través de estas secuencias que unen NF- κ B.

De acuerdo con las evidencias previas de inhibición de la apoptosis por una sobre-expresión de RAC3, se investigó además su posible rol en autofagia, cuyo rol en tumorigénesis es dual. En principio, el proceso opera con el objeto de eliminar desde moléculas mal plegadas hasta organelas dañadas y de este modo preservar la supervivencia celular, sin embargo, cuando ocurre de modo exacerbado puede llevar a la muerte celular. En situaciones de estrés, ayuno o falta de oxígeno a los cuales la vía de señales dependiente de mTOR es sensible, se activa la autofagia con el objeto de obtener energía para la supervivencia celular a partir del reciclado de moléculas propias. Esto es precisamente lo que les ocurre a las células menos expuestas en una masa tumoral.

En estos estudios demostramos que RAC3 tiene un rol protector de autofagia inducida tanto por ayuno como por inhibición de la vía mTOR por Rapamicina. Demostramos además, que la hipoxia inhibe la expresión de RAC3 generando un ambiente permisivo para que la autofagia ocurra, permitiendo la supervivencia tumoral.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, demuestran que la participación de RAC3 como regulador de la autofagia es un mecanismo adicional a los ya descritos por los cuales promueve tumorigénesis y el microambiente inflamatorio tumoral podría contribuir en la regulación de la expresión de RAC3 y su acción oncogénica.

AGRADECIMIENTOS

Bueno, llego el momento tan esperado. No sé si habla bien de mí como científica pero esta sección es lo primero que miro en las tesis. Como bien debe saber cualquier persona que ha realizado una tesis, requiere mucho esfuerzo, y en el medio está la vida personal, económica y por supuesto la suerte misma. Si tuviese que definir la palabra de mi tesis, creo que es la Perseverancia, y es que me he llegado a preguntar si es una virtud o mi peor defecto...en algún momento me sentí como una mosca contra el vidrio. Pero es cierto que se deben terminar las cosas y el tiempo mismo nos da la respuesta, y creo que elegí el trabajo que me moviliza más allá de todo.

Antes que nada qué dichosa me siento de tener tanta gente a la que agradecer. He recibido mucha ayuda para este trabajo y el tiempo con sus cosas en que lo hice, la verdad mucha más de la que esperaba (también me costó mucho más jajaj). Recuerdo que la tarea de cada persona que ingresaba al labo era darle una mano a Ceci....Entonces para que quede inmortalizado en estas hojas que tal vez lea otro mal científico como yo...Ahí va....the history

Tengo que empezar con Moni, porque fue su pasión por la ciencia pero pensando en lo humano, y sus enseñanzas no enciclopedistas cuando la tuve de profesora o tal vez su dramatización literal de la polimerasa poniendo nucleótidos para la sintetizar el ARNm de la proteína pirulo lo que me hizo querer ingresar en el grupo de células suicidas, jajaja, y ¡me aceptó! Qué te puedo decir Moni, ¡como me malcriaste! Recuerdo las corridas, no creo que cualquier director vaya a un ciber en once a las 23.30 hs para terminar la presentación de la becaria a CONICET que culmina a las 00 hs., y bueno cuantas presentaciones a congresos, gracias por llevarme siempre a los congresos y con dinero de tu propio sueldo y sueldo de Conicet! gracias por la misma corrección de este trabajo con tantos km de distancia. Me llevo muchas enseñanzas de trabajar con alguien con esa cabeza, cuántas ideas y de lo humano ni hablar, no creo que hubiese sobrevivido a la ciencia sino hubiese estado rodeada de buenas personas...vos sabes.

Gracias por transmitirme la pasión por la ciencia a todos en el labo, ¡¡cuántos fin de semana estuvimos allí!! Al principio aunque ya se iban, recibí consejos y buena onda de Nacho y Pablo. También tuve la suerte de trabajar un tiempo con Shorshi, cada experimento parecía una aventura, ¡¡una expedición!! Gracias por la buena onda, por las clases, y los ricos almuerzos compartidos, gracias por los retos también y por preocuparte por mí. Gracias a Ceci Escaris que también me ayudó., creo que todavía tengo alguna hoja con dibujitos jajaj. Pablo Galarza, gracias igual recuerdo los experimentos con Rapa hasta cualquier hora. Marina, en su momento fuimos compañeras del turno noche, cuantos geles grandes y maratónicos corrimos, gracias por la enseñanzas de bioseguridad y la compañía y por la dramatización con el rojo ponceau! Nicos, como te dije cuando entraste a carrera siempre fuiste un investigador, siempre pensando el sentido y por qué hacemos esto o aquello, cuantas charlas de capuchinos, y bueno bendito tu eres. Laura si bien estuvimos poco juntas cuantas cosas personales importantes pasamos y en ese poco tiempo, ¡cuánto me ayudaste en la mudanza! Sabri querida, gracias por tantos consejos maternos, abrazos sinceros y muy muy buenos momentos, seguimos en contacto de parte de mis celulitas también jjeje. Gi, nos conocimos poco pero ¡logramos clonar ese promotor! Gracias, gracias y por levantar mi autoestima y por los capuchinos. Fer ¡no voy a decir que sos memoriosa! Y te deje para el final (ya te conozco) Jajaj...porque solo diré que me sorprendiste y que has cargado una gran mochila de experimentos de esta tesis y te lo agradezco mucho, así como los ravioles con tinta de calamar y otros manjares y bebibles que en su momento compartimos con Shorsh. En Gral. Les agradezco a todos como bien se dice, la segunda familia, las sonrisas, las largas terapias y algo que se que cuesta mucho hacer experimentalmente más allá de las largas horas o deshoras como fue el in vivo, se que a muchos nos tocó el corazón y costo hacerlo, y no solo eso como hicimos todo en equipo, gracias, gracias, gracias. Debe aparecer tantas veces la palabra gracias como RAC3, ¡las conté!

En el Instituto además recibí ayuda de otros grupos, a los chicos del laboratorio de Tripanosoma...A Mariana por dedicarme sus tiempos, a Gasman que hasta me busco papers y sobre todo a Berti....creo que todos tus consejos

fueron muy atinados, gracias por la ayuda bioinformática, por todo el tiempo de cátedras, y por las clases de taxonomía que nunca entenderé gracias Doc. jajaja. Al grupo de riñón....ah recuerdo cuando con Ceci Escaris ¡teñimos su labo de azul! ...a Luis, gracias por la buena onda para compartir equipos, por los consejos in vivo, y bueno Pablo Arzumendi "Pablito" que te puedo decir pienso en nuestras charlas y solo viene la sonrisa...que linda manera de vivir y se transmite...te agradezco muchísimo la ayuda para mi trabajo y consejos...y haber ayudado a Fer con mis cosas. Pero más que nada las sonrisas. A las chicas de Bachi jaja gracias por dejarme ir a alborotar su labo...por los consejos y opiniones por la buena onda...Yani gracias, no sé cuántas veces me enseñaste a usar la Metler y aún hoy estamos en contacto y Gabi gracias por tus locuras, los mejores recuerdos mexicanos. A las chicas de bioterio por la ayuda brindada... ¡Ay! Margarita...gracias por preocuparte por mí, por mis cosas, por mi nena, cuantos fin des nos veíamos....tus caras ja,.. Tus miradas lo decían todo. Yesi....¡espero ya no te hagas tantos dramas! eras una niña....jajaj.. A Cristina Aguirre por su gran interés médico por la ciencia y sus pacientes, siempre nos recibiste con una sonrisa. A Graciela de micro, a las "chicas" de patología por la ayuda con las biopsias, la verdad los mejores recuerdos Lanarienses tuve la suerte de conocer al Dr. Semeniyuk y su humildad, a don Dr. Finkielman con sus charlas de mitología griega pipa en mano. En fin a las chicas de Felisa por la ayuda con las llaves y los consejos sueriles.

A mi papá, gracias por brindarme la oportunidad de hacer lo que me gusta, pero por sobre todo enseñarme que eso no me hace más que nadie. Obviamente no sería lo que soy o no intentaría serlo si no hubiesen creído en mí, y a mamá donde quiera que estés, gracias mostrarme que uno solo da lo mejor y el resto no está en nosotros, cuando te fuiste tuve que reencontrarme. A mi hermano por ayudarme con las correcciones y cubirme cuando enfermaba la niña. Seba...cuántos años, cuántas cosas hemos vivido juntos gracias, gracias por escuchar tantas charlas científicas y seguir amándome jajaj, por comprender que se trabaja más solo por amor a la ciencia, ¡¡sobrevivimos!!!..Gracias por estos años donde solo me dedique a esta escritura. A toda la familia que también tuvo

que colaborar con la escritura, a María, a Sara, a mi cuñado por salvarme con su PC. A doña Mary muchas gracias por tanto aliento y mimarme, A mi tia Rosita, cuanta fortaleza en ese pequeño cuerpo. A Cris Galloto, por tanta terapia buenos momentos y sandwichitos de miga jaja. A mis hermanos del alma: Mila, Fede, Danis, Laly. A la Universidad de Quilmes por mi formación, bueno a todos los que nos permiten ser. Al Dr. Carlos Davio mi consejero de tesis por la celeridad y buena onda con la que siempre me contesto.

ÍNDICE

RESUMEN	1
----------------	----------

AGRADECIMIENTOS	5
------------------------	----------

INTRODUCCIÓN

I. RAC3 ES UN COACTIVADOR DE LA FAMILIA DE P160	20
I.i Estructura general de los SRC's	21
I.ii Mecanismos de acción de los SRC's	23
I.iii Rol fisiológico de la familia de SRC's	24
II. RAC3: EL PROTAGONISTA	24
II.i Rol fisiológico de RAC3: modelo de ratón RAC3 deficiente	25
II.ii Caracterización de RAC3	26
II.iii RAC3 no es solo un coactivador de receptores nucleares	28
II.iv Localización subcelular de RAC3	29
II.v Modificaciones post-traduccionales de RAC3	31
a) Acetilación y metilación de RAC3	32
b) Fosforilación de RAC3	32
c) Degradación de RAC3	33
III. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NUCLEAR NF-κB	34
III.i. Activación de NF-κB	36
a) Vía Canónica	37

b) Vía No Canónica	39
c) Vía de Activación por daño al ADN	39
III.ii Genes blanco de NF-κB	41
III.iii Inducción de NF-κB por la citoquina pro-inflamatoria TNF	42
 IV. LA RESPUESTA INFLAMATORIA	 44
IV.i. RAC3 en la respuesta inflamatoria	46
 v. GLUCOCORTICOIDES	 48
V.i El eje HPA	49
V.ii. El receptor de glucocorticoides	50
V.iii. Activación de GR mediada por glucocorticoides	52
V.iv. Transrepresión mediada por GR	54
a) Modelo de diafonía	55
b) Modelo de competencia por coactivadores	56
c) Regulación de la expresión de IκB	56
 VI. TUMORIGÉNESIS Y DESARROLLO TUMORAL	 57
VI.i. Inflamación vs cáncer	59
VI.ii. La inflamación como promotora tumoral	61
 VII. RAC3 UN ONCOGÉN <i>BONA FIDE</i>	 63
VII.i. Modelo de ratones transgénicos de RAC3	63
VII.ii. RAC3 se encuentra en altos niveles en una amplia gama de tipos tumorales	64
VII.iii. Regulación de la expresión de RAC3	70
VII.iv. RAC3 y sostenimiento de las señales proliferativas	71
VII.v. RAC3, ciclo celular y supresores tumorales	72
VII.vi. Resistencia a la muerte celular: RAC3 protege de la apoptosis	75
VII.vii RAC3 en la activación de la invasión y metástasis	78
VII.viii.RAC3Δ4	79

VIII. AUTOFAGIA	80
VII.i La vía mTOR y Rapamicina	85
a) mTORC1	86
b) Señales que activan o inhiben a Mtor	88
c) La vía mTOR en cáncer y RAC3	89
IX. ANGIOGÉNESIS E HIPOXIA	90

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis y objetivos	93
La hipótesis	97
Objetivo Principal	97
Objetivos específicos	98

MATERIALES Y MÉTODOS

I. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	100
II. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS UTILIZADOS CON ÁCIDOS NUCLEICOS	
II. i. Vectores de expresión y plásmidos reporteros	100
II. ii. Preparación de bacterias quimiocompetentes	106
II. iii. Transformación de bacterias	107
II. iv. Preparación de ADN a pequeña escala	108
II. v. Purificación de plásmidos a gran escala	109
a) Purificación del cromosoma artificial de bacteria RP11-456N23	109
II. vi. Cuantificación de ADN y ARN	110
II. vii. Geles nativos de agarosa	111

II. viii. PCR en tiempo real (RT-qPCR)	111
a) <i>Primers</i> ARN mensajero humanos	112
b) <i>Primers</i> ARN mensajero ratones	113
 III. TÉCNICAS, PROCEDIMIENTOS Y REACTIVOS EMPLEADOS EN CULTIVOS CELULARES	
III. i. Cultivos celulares humanos utilizados	114
III. ii. Principales reactivos empleados como estímulo o tratamiento en los experimentos en cultivo	116
III. iii. Transfección de células en cultivo	116
a) Transfección transitoria utilizando el reactivo <i>Lipofectamine</i> ™	116
b) Transfección por el método de cloruro de calcio	117
c) Control de transfección	118
III. iv. Inducción de la autofagia	119
III. v. Monitoreo de la autofagia	120
 IV. TÉCNICAS UTILIZADAS <i>IN VITRO</i>	
IV. i. Análisis de expresión de genes reporteros	120
a) Cosecha de células y preparación de extractos	120
b) Detección de actividad Luciferasa	121
c) Medición de actividad Luciferasa	121
IV. ii. Análisis de actividad kinasa	122
a) Preparación de extracto proteico para kinasa	122
IV. iii. <i>Western blot</i>	123
a) Preparación de extractos proteicos	123
b) Determinación de la concentración de proteínas	124
c) Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes	124
d) (SDS-PAGE) y transferencia a membrana	124
e) Ensayo de <i>western blot</i>	125
IV. iv. Ensayo de inmunofluorescencia	127
IV. v. Inmunohistoquímica	128
IV. vi. Inmunoprecipitación de la cromatina (CHIP)	129
a) Preparación de las muestras	129

b) Reacción de inmunoprecipitación de cromatina	130
IV. v. Anticuerpos utilizados	132

V. PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS EMPLEADAS *IN VIVO*

V. i. Mantenimiento de animales de laboratorio	133
V. ii. Modelo experimental <i>in vivo</i>	133
V. iii. Obtención de extractor de ARN total y proteínas	134

RESULTADOS

I. LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE RAC3 SON REGULADOS POSITIVAMENTE EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA

I.i. La respuesta inflamatoria aumenta los niveles del gen de RAC3 en bazo	136
I.ii. La citoquina inflamatoria TNF aumenta la expresión del gen de RAC3	139
I.iii. El aumento en la expresión de RAC3 por la citoquina TNF involucra la vía NF- κ B	143
I.iv. La vía de p38 participa en la regulación de RAC3 por la citoquina TNF	146
I.v. El fragmento de 5Kb río arriba del gen de RAC3 contiene posibles etiquetas blanco de unión a factores de transcripción involucrados en el desarrollo tumoral	149
I.vi. Las zonas evolutivamente conservadas en las secuencias regulatorias del gen de RAC3 contienen sitios de unión a factores de transcripción involucrados en tumorigénes	150
I. vii. La expresión de RAC3 es regulada por el factor de transcripción NF- κ B	153
I.viii. Señales pro- y anti-inflamatorias actúan activan el	

	promotor de RAC3	156
I.ix.	RAC3 es necesario para la respuesta de transactivación de GR y NF- κ B	158
I.x.	NF- κ B actúa positivamente sobre el promotor de RAC3	161
I.xi.	NF- κ B activado por el estímulo con TNF es reclutado a su secuencia blanco en el promotor de RAC3	162

II.	LA VÍA mTOR ESTÁ INVOLUCRADA EN LA REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE RAC3	165
II.i.	La inhibición de la vía mTOR disminuye los niveles proteicos de RAC3	165
II.ii.	La Rapamicina inhibe la expresión de RAC3 a nivel transcripcional	166
II.iii.	Localización de RAC3 en tumores no dependientes de hormonas	168
II.iv.	La sobre-expresión de RAC3 inhibe la autofagia	170
II.v.	Células tumorales con alto RAC3 endógeno no responden al estímulo inductor de la autofagia	174
II.vi.	La disminución de los niveles endógenos de RAC3 en células tumorales sensibiliza a la autofagia	175
II.vii.	El rol de RAC3 en la autofagia implica señales nucleares y citoplasmáticas	177
II.viii.	La hipoxia induce la autofagia en células tumorales	181
II.ix.	La hipoxia induce la autofagia mientras disminuye los niveles de expresión de RAC3	183
II.x.	La hipoxia afecta la actividad del promotor de RAC3	187
II.xi.	La sobre-expresión de RAC3 es incapaz de revertir la autofagia inducida por hipoxia	188
II.xii.	La hipoxia disminuye la expresión de RAC3 por mecanismos adicionales al control de su promotor	190

CONCLUSIONES	193
DISCUSIÓN	197
PUBLICACIONES	210
ABREVIATURAS	212
BIBLIOGRAFÍA	216

FIGURAS

Figura 1.	Esquema de los SRC's con sus dominios conservados	22
Figura 2.	Representación esquemática del gen de RAC3	26
Figura 3.	Estructura general, dominios de RAC3 y sitios de fosforilación descriptos	27
Figura 4.	RAC3 es coactivador del Factor de transcripción no esteroideo NF-κB	29
Figura 5.	Modificaciones post-traduccionales de RAC3	34
Figura 6.	La Familia de NF-κB	36
Figura 7.	Vías de activación de NF-κB	40
Figura 8.	Genes blanco de NF-κB y las vías en las que están involucrados	42
Figura 9.	Modelo de señalización de TNF	44
Figura 10.	Modelo esquemático del eje HPA	50
Figura 11.	Principales dominios del receptor de Glucocorticoides (GR)	52
Figura 12.	Vía de señalización de GR	55
Figura 13.	Distintos modelos descriptos para la transrepresión GR/NF-κB	57
Figura 14.	Principales ventajas que logran adquirir o eludir las células	

	tumorales para su desarrollo y avance a la malignidad	59
Figura 15.	Esquema representativo de las diferentes fases del ciclo celular	74
Figura 16.	Descripción de las tres principales etapas de formación del autofagosoma y las moléculas intervinientes	83
Figura 17.	Principales diferencias entre las distintas formas de muerte celular	84
Figura 18.	La vía mTOR y la multiplicidad de señales que censa, vías que activa e integra	86
Figura 19.	Vía mTORC1	88
Figura 20.	Esquema representativo de la construcción promRAC3-Luc	105
Figura 21.	RT-qPCR contra RAC3 de algunas líneas celulares utilizadas	115
Figura 22.	La dosis de LPS utilizada induce la respuesta inflamatoria	137
Figura 23.	Señales pro- y anti-inflamatorias regulan la expresión de RAC3 en bazo	138
Figura 24.	TNF regula positivamente los niveles de ARNm de RAC3	141
Figura 25.	TNF y Dex aumentan los niveles de RAC3 a nivel proteico en células HEK293	142
Figura 26.	El estímulo con Dex 500nM aumenta la actividad GRE-Luc	143
Figura 27.	La dosis de Sulfazalacina utilizada inhibe la actividad de NF- κ B inducida por TNF	145
Figura 28.	TNF y Dex inducen el aumento en la expresión del gen de RAC3 en células T47D	146
Figura 29.	El inhibidor de la vía de p38 es efectivo en la dosis utilizada	147
Figura 30.	La vía de p38 participa en la regulación de RAC3 por TNF	148
Figura 31.	Análisis Bioinformático del promotor de RAC3	150
Figura 32.	Zonas conservadas evolutivamente en el promotor de RAC3 entre especies relacionadas	152
Figura 33.	Control de transfección y actividad de los vectores de expresión sobre etiquetas de NF- κ B	154
Figura 34.	NF- κ B aumenta la expresión de RAC3	155
Figura 35.	NF- κ B aumenta los niveles de ARN mensajero de RAC3	156
Figura 36.	TNF y Dex activan el promotor de RAC3	157
Figura 37.	RAC3 es requerido para la transactivación de NF- κ B y de GR	159
Figura 38.	La expresión de RAC3 es requerida para la transactivación de NF- κ B y de GR	160

Figura 39.	NF-κB actúa positivamente sobre el promotor de RAC3	162
Figura 40.	La etiqueta de NF-κB hallada bioinformáticamente en el promotor de RAC3 es funcional	164
Figura 41.	La inhibición de la vía mTOR disminuye los niveles proteicos de RAC3	166
Figura 42.	El inhibidor de la vía mTOR Rapamicina disminuye los niveles de expresión de ARNm de RAC3	167
Figura 43.	Expresión de RAC3 en cortes renales	169
Figura 44.	Expresión y localización de RAC3 en biopsias de colon	170
Figura 45.	Control de niveles de expresión de RAC3 post-transfección en células HEK293	171
Figura 46.	La sobre-expresión de RAC3 disminuye la autofagia	172
Figura 47.	Disminución de los niveles de autofagia obtenidos al sobre-expresar RAC3	173
Figura 48.	Células tumorales con alto RAC3 no muestran diferencias en los niveles de autofagia inducida por ayuno	175
Figura 49.	La disminución de RAC3 aumenta los niveles células en autofagia	176
Figura 50.	Actividad de NF-κB en células sometidas al ayuno	178
Figura 51.	Niveles de células autofágicas en condiciones de ayuno	180
Figura 52.	La hipoxia induce la autofagia en células tumorales	182
Figura 53.	Los niveles proteicos de RAC3 disminuyen en condiciones de hipoxia	184
Figura 54.	El ARNm de RAC3 disminuye significativamente en condiciones de hipoxia	185
Figura 55.	Expresión y localización de RAC3 y LC3 en biopsias de adenocarcinoma de colon	186
Figura 56.	La hipoxia disminuye la actividad del promotor de RAC3 clonado	187
Figura 57.	La sobre-expresión de RAC3 no revierte la autofagia inducida por hipoxia	190
Figura 58.	Los niveles de expresión de RAC3 disminuyen también bajo el control de un promotor exógeno	192

TABLAS

Tabla 1.	Niveles de expresión y/o amplificación en tumores hormono-dependientes	67
Tabla 2.	Niveles de expresión y/o amplificación en tumores hormono-independientes	69
Tabla 3.	Programa de ciclado utilizado para amplificar la secuencia regulatoria 5´- gen de RAC3	105
Tabla 4.	<i>Primers</i> utilizados en las distintas RT-qPCR	113
Tabla 5.	Líneas celulares humanas utilizadas en este trabajo de tesis	114
Tabla 6.	Principales reactivos utilizados en los experimentos sobre cultivos celulares de este trabajo de tesis	116

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

I. RAC3 ES UN COACTIVADOR DE LA FAMILIA DE p160

La familia de coactivadores de receptores esteroideos (SRC's) o p160 reúne a tres moléculas agrupadas por su alta homología y un peso molecular de 160KDa denominadas: SRC-1 ^[1] o NcoA1 (*Nuclear receptor coactivator 1*); TIF2 (*Transcriptional Intermediary Factor (TIF) 2*), también conocido como GRIP1 (*glucocorticoid interacting-receptor protein 1*), SRC-2, NCoA2 ^[2, 3] y finalmente RAC3 (*RAR-associated coactivator-3*).

Los primeros miembros identificados mediante ensayos de interacción con receptores esteroideos en el año 1995 y 1996, respectivamente, fueron SRC-1 ^[1] y TIF2 ^[4], por ello el nombre de la familia. Su tercer miembro, RAC3 fue descubierto en 1997 en una región cromosómica amplificada de cáncer de mama y ovario ^[5].

Si bien en un principio se consideraba que estas moléculas en cantidades limitantes que hacían funcionar a los factores de transcripción no eran más que un “puente” o adaptador con la maquinaria basal transcripcional ^[6], hoy se sabe que los coactivadores por si mismos aumentan marcadamente la capacidad transcripcional de los distintos factores.

En general, los coactivadores aumentan la actividad transcripcional sin unirse directamente al ADN, sino interaccionando indirectamente con otras proteínas que sí se unen. Dentro de los mecanismos mediante los cuales coactivan incluyen el reclutamiento más eficiente de la maquinaria basal de transcripción y actividades enzimáticas propias o de otras proteínas asociadas. Sus actividades enzimáticas *per se* en general producen el remodelamiento de la cromatina por fosforilación dependiente de ATPasas, acetilaciones como la del coactivador general de unión a CREB (proteína de unión a elementos regulatorios de AMPc) (CBP/p300), SRC's; metilaciones como la metil transferasa de arginina

asociada a coactivadores (CARM-1) y ubiquitinaciones como E6-AP (*associated protein of ubiquitin-activating enzyme 6 (E6)*). A su vez, la asociación de los factores de transcripción y de los coactivadores a un determinado promotor se encuentra regulada temporalmente ^[7] llevando a un proceso ordenado y coordinado ^[8].

Los tres miembros de la familia de p160 interaccionan con receptores nucleares (NRs) de forma ligando dependiente, y aumentan su actividad transcripcional en forma dosis dependiente ^[9]. Las preferencias de los NRs a diferentes coactivadores está vinculada con la estructura del dominio de unión al ligando (LBD) de los NRs ^[10-12].

Actualmente la diversidad de funciones halladas para algunas de estas moléculas excede su acción como coactivador, con funciones menos esperadas relacionadas con el *splicing* del ARN o el control de reacciones citoplasmáticas como la traducción, funciones mitocondriales y el tráfico intracelular, tal como hemos demostrado recientemente ^[13, 14]. Sumándose a la importancia de los coactivadores se postula que la formación de complejos multiproteicos tiene una función integradora de múltiples vías de señalización celular que puede permitir al genoma censar el impacto del microambiente celular de tal manera que los coactivadores puedan organizar la expresión de "grupos funcionales" de genes que participan en la respuesta a un régimen regulatorio específico, por ejemplo los implicados en el metabolismo, el crecimiento, la diferenciación o la muerte celular. Entonces, los coactivadores, a través de su asociación específica a determinados factores de transcripción, que a su vez controlan la expresión de genes blanco específicos, podrían estar desempeñando ese rol integrador para una respuesta eficiente ^[15].

I. i. ESTRUCTURA GENERAL DE LOS SRC's

Los integrantes de la flia. de SRC's tienen una similitud de secuencia de 50-55%, y una identidad de secuencia de 43-48% (Figura 1). Sus miembros.

comparten una estructura común que incluye un dominio básico de hélice-vuelta-hélice en el extremo N-terminal, un dominio de homología Per/ARNT/Sim (PAS), una región central de interacción con los NRs (RID) con tres motivos LXXLL (donde L es leucina y X es cualquier aminoácido) que forma una hélice-alfa anfipática que se une la hendidura hidrofóbica de los LBD (dominio de unión a ligando) de los NRs luego de la unión del ligando ^[16]. Aunque mutaciones en alguno de los tres motivos de LXXLL (L1, L2 y L3) anulan la interacción del SRC con los NRs, se vio que diferentes motivos de LXXLL y el contexto de la secuencia donde se encuentran, contribuyen a la unión selectiva de diferentes NRs ^[17]. A su vez, poseen dos dominios de activación transcripcional C-terminal (AD1 y AD2) ^[18-21]. La región AD1 es responsable de la interacción con el coactivador general de unión a CREB (CBP) y p300 ^[22], mientras que la región AD2 es capaz de interaccionar con metil transferasas, que provocan el remodelamiento de la cromatina en forma local y el ensamblado de la maquinaria de transcripción en el promotor ^[23, 24].

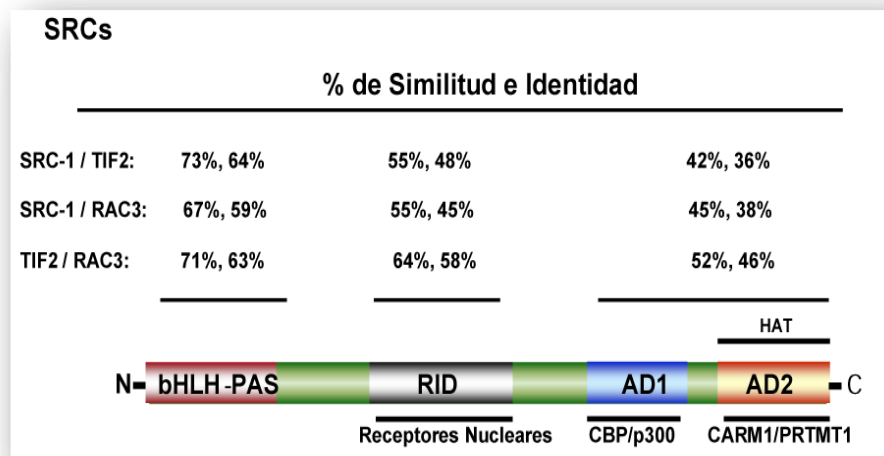


Figura 1. Esquema de los SRC's con sus dominios conservados. Básico de hélice-vuelta-hélice (bHLH); dominios homólogos a Per/ARNT/Sim (PAS); dominio de interacción con receptores nucleares (RID), dominio de activación transcripcional (AD1 y AD2). Adaptado de Xu y Li, 2003 ^[25].

I. ii. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS SRC's

Se ha demostrado que SRC-1 y RAC3 tienen actividad acetil transferasa (HAT), en su dominio C-terminal ^[20, 26] aunque es más débil que la de CBP y p300 ^[26, 27]. En este sentido se sabe que existe una correlación entre acetilación de histonas / aumento de la actividad transcripcional ^[28, 29]. También se ha descrito que su capacidad de acetilar no se limita solo a Histonas, por ejemplo RAC3 es acetilado por p300 o CBP alterando su asociación con el ER ^[30] y en el caso de la acetilación de factores de transcripción esta modificación puede alterar la unión al ADN, la interacción proteína-proteína o la localización subcelular.

Por otro lado, al interaccionar con coactivadores generales como CBP y p300 ^[19, 27], los SRC's permiten a los NRs reclutar más enzimas con actividad HAT o también pueden reclutar otras enzimas como CARM-1 que se une su región C-terminal y metila a la Histona H3, aumentando la activación transcripcional mediada por los NRs ^[31].

Si bien los integrantes de la familia de SRC's tienen cierta redundancia funcional, cada vez es más la evidencia que sugiere que los SRC's tienen roles diferentes en los procesos biológicos, varios reportes sugieren que sus actividades no se superponen, y que existe una división entre las funciones de SRC-1 y TIF2 *versus* RAC3.

Resulta importante destacar que las concentraciones limitantes de los SRC's sugieren que pequeños cambios en sus niveles o actividades serían maneras eficientes de regular la expresión génica. Además existen numerosos estudios donde se demuestra que cascadas de señales activadas por estímulos como hormonas, factores de crecimiento y citoquinas inducen múltiples modificaciones post-traduccionales cuya dinámica tiene un rol crucial determinando la estabilidad de la proteína, su especificidad de interacción con distintos factores de transcripción y por otro lado son el nexo de las funciones de los SRC's con el microambiente celular.

I. iii. ROL FISIOLÓGICO DE LA FAMILIA DE SRC'S

El conocimiento del rol fisiológico de la familia SRC's se obtuvo principalmente mediante estudios *in vivo* en modelos de ratón *knockout* los que indican que cada miembro de la familia tiene funciones específicas aunque también se ha observado cierta cooperatividad en las funciones fisiológicas entre sus miembros en ratones doble *knockout*. Por ejemplo, la mayoría de los ratones SRC-1^{-/-}; TIF2^{-/-} no sobreviven y machos o hembras de ratones SRC-1^{+/-}; TIF2^{-/-} son completamente infértiles [32].

Además se ha descrito que SRC-1 y RAC3 regulan cooperativamente la viabilidad, el metabolismo y el balance energético. Por otro lado, la mayoría de los ratones SRC-1^{-/-}; RAC3^{-/-} mueren antes de nacer y los ratones que sobreviven exhiben compromiso en la regulación de genes blanco de PPAR γ involucrados en adipogénesis y desacoplamiento mitocondrial, así como altos niveles de leptina y defectos en la termogénesis adaptativa, entre otros [33].

Es importante resaltar que la viabilidad de ratones SRC-1^{-/-} podría deberse en parte a la sobre-expresión compensatoria de TIF2 que se observa en algunos tejidos [34], mientras que los niveles de RAC3 no cambian en estos tejidos en comparación con los ratones control, apoyando nuevamente la idea de un rol funcional diferente de este coactivador versus TIF2 y SRC-1.

II. RAC3: EL PROTAGONISTA

RAC3 fue descubierto en simultáneo por varios grupos de investigación, lo que derivó en que tome diferentes nombres al mismo tiempo: 1) Mediante el sistema de doble híbrido de levadura, se clonó el coactivador asociado al receptor del ácido retinoico (RAR), RAC3 (*RAR-associated coactivator-3*) y se demostró que podía interaccionar con múltiples NRs aumentando la actividad transcripcional del receptor de andrógenos (AR) y progesterona (PR) [20]. 2) Se aisló a p/CIP (*p300/CBP cointegrator-associated protein*) interaccionando con el dominio C-terminal de CBP y con ER [19]. 3) Usando RAR β como cebo en el

sistema simple híbrido de levaduras, se identificó a ACTR (*activator of thyroid and retinoic acid receptor*) y se demostró que interacciona con los NRs, CBP y p/CAF^[35]. Este estudio mostró además que ACTR posee actividad HAT. 4) Recorriendo una biblioteca de expresión de ADN copia del receptor tiroideo $\beta 1$ (TR), se aisló un clon que codificaba para TRAM-1 (*thyroid receptor activator molecule-1*) y se demostró que interaccionaba con TR y otros receptores de manera ligando dependiente^[36]. 5) En base a la interacción con los LBD de $ER\alpha$, se identificó a SRC-3 (*steroid receptor coactivator-3*) y se demostró que tenía mayor afinidad por $ER\alpha$ que por $ER\beta$ ^[37]. 6) Se observó a este coactivador amplificado en cáncer de ovario y mama, por esta razón también se lo denomina AIB1 (*amplified in breast cancer 1*)^[5].

II. i. ROL FISIOLÓGICO DE RAC3: MODELO DE RATÓN RAC3-DEFICIENTE

En ratones $RAC3^{-/-}$ machos, la función reproductiva está levemente reducida, mientras que en hembras el desarrollo y las funciones del sistema reproductivo son anormales. Los niveles de estrógenos están reducidos causando un retraso en el desarrollo pubertal evidenciado por un retraso en la abertura de la vagina y el desarrollo de las glándulas mamarias. Además, el desarrollo alveolar de las glándulas mamarias en respuesta a estímulos combinados de estrógeno y progesterona, disminuye significativamente en hembras $RAC3^{-/-}$ ^[38].

Por otro lado, los ratones $RAC3^{-/-}$ son más pequeños que los *wild type*, y muestran en general, un retraso madurativo. Esto sugiere que RAC3 es requerido para el crecimiento normal a pesar de que se observó que los niveles de la mayoría de los receptores nucleares aparecen intactos. Mientras que sí se observó que decrecen significativamente los niveles de IGF-1 y falla su respuesta^[14].

II. ii. CARACTERIZACIÓN Y MODO DE ACCIÓN DE RAC3

El gen de RAC3 en humanos denominado *ncoa3* (*homo sapiens nuclear receptor coactivator 3*) tiene una longitud de 155021pb y mapea en el brazo largo “q” zona de bandeo 12 del cromosoma 20 del genoma humano (20q12) ^[38], específicamente entre las posiciones 16326949-16481709 (NG_016810.1, NCBI *Reference Sequence*). El gen codifica un transcrito de 7935pb, contiene 23 exones y traduce a una proteína de 160KDa, entre el exón 2 al 22. La organización se puede apreciar en la Figura 2 donde se evidencia la presencia del primer exón no traducible de 118pb ^[39] a más de 40kb del segundo exón.



Figura 2. Representación esquemática del gen de RAC3. Se muestra en verde la secuencia nucleotídica en el genoma, en gris los exones, en rojo un ARN mensajero descrito y en amarillo los codones traducidos.

La proteína de RAC3 posee un 40% de similitud con el resto de la familia. A través del dominio bHLH-PAS puede interactuar con Miogenina, MEF-2C (*myocyte enhancer factor-2 MEF-2*) y el factor activador transcripcional (TEF) ^[40, 41]. A su vez este dominio estaría involucrado en la unión al ADN y la heterodimerización entre proteínas que también poseen este dominio ^[38]. Posee una región rica en Serina y Treonina por la que puede interactuar con activadores de la transcripción como E2F ^[42] y STAT ^[43] (Figura 3).

Por otro lado, dentro de su dominio bHLH se encuentra una señal de localización nuclear bipartita (NLS) hallada mediante estudios de mutagénesis dirigida donde se identificó a dos grupos de aminoácidos básicos interdependientes entre los residuos 16-38 que son necesarios para la localización nuclear ^[44].

RAC3 tiene seis motivos consenso LXXLL, con aminoácidos cargados que forman las hélices anfipáticas de interacción con dominios hidrofóbicos de diversas proteínas y en particular con los NRs. A diferencia de SRC-1 y TIF2, RAC3 posee 26 residuos consecutivos de glutamina.

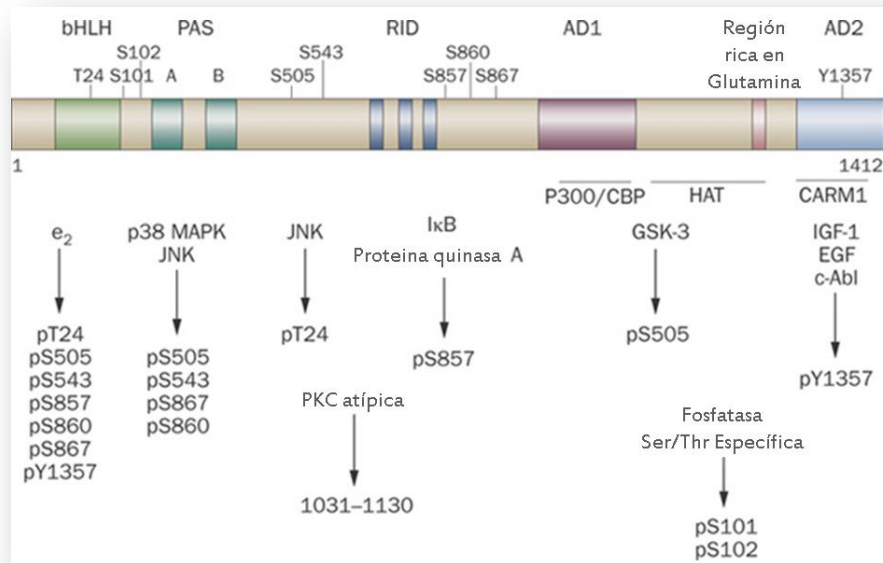


Figura 3. Estructura general, dominios de RAC3 y sitios de fosforilación descritos. Se muestran los dominios desde la zona N-terminal a C-terminal: básico de hélice-vuelta-hélice (bHLH); dominios homólogos a Per/ARNT/Sim (PAS); S/T, región rica en Serina y Treonina; dominio de interacción con receptores nucleares (RID), dominio de activación transcripcional (AD1 y AD2), región rica en Glutamina. Actividad histona acetil transferasa (HAT); factor de crecimiento de insulina 1 (IGF-1); factor de crecimiento epidérmico (EGF); homólogo del oncogén viral de leucemia murina de Abelson 1 (c-Abl); coactivador-asociado arginina metil transferasa 1 (CARM-1); glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3); c-Jun N-terminal quinasa (JNK); proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK); proteína quinasa C (PKC). Adaptado de Gojis, O., et al. 2009 ^[45].

En su estructura posee dos dominios de activación transcripcional intrínsecos (AD1 y AD2). Siendo AD1 responsable de la interacción con histonas acetiltransferasas como CBP ^[46, 47].

Además también se ha reportado que RAC3 podría contener una señal de exportación nuclear (NES) CRM1-dependiente en el extremo C-terminal,

particularmente entre los aminoácidos 1033-1085 que contiene dos regiones ricas en Leucina (LCD4 y LCD5) que se asemejan a sitios consenso de exportación nuclear ^[48].

RAC3 posee actividad HAT fuerte y además, es capaz de reclutar a los coactivadores generales CBP y p/CAF, formando un complejo multiproteico de coactivación ^[20]. El dominio AD2 puede interaccionar con la proteína Arginina metil transferasa (PRMT) PRMT-1 y CARM-1^[23, 24], así como con el factor de transcripción AP-1 ^[49].

RAC3 posee múltiples sitios de fosforilación por los que puede regularse su actividad, localización y vida media que son blanco de diversas kinasas y fosfatasas como se muestra en la Figura 3 y que serán descritos más adelante en esta tesis.

En lo referente a su expresión tejido-específica o constitutiva basados en ensayos de *northern blot*, la expresión del gen de RAC3 fue localizada en placenta, páncreas, pulmón, riñón, cerebro, hígado, útero, pituitaria, glándula mamaria y testículos ^[20, 34, 36, 50]. La proteína se encontró expresada en testículos, pulmón, cerebro, corazón y glándula mamaria ^[19, 38]. En todos los casos, en condiciones normales, su expresión es muy limitada y de difícil detección por *western blot*.

II. iii. RAC3 NO ES SOLO UN COACTIVADOR DE RECEPTORES NUCLEARES

Si bien en un principio los SRC's fueron descubiertos como coactivadores de NRs, en el año 1996 se asoció a SRC-1 con el factor de respuesta a suero (SRF) ^[51], y al año siguiente a RAC3 con la proteína de unión a elementos regulatorios de AMPc (CREB) ^[19]. En este contexto, cabe destacar que en el año 2000 nuestro grupo descubrió que RAC3 también es coactivador de NF- κ B ^[46], factor de transcripción no esteroideo y que, como profundizaremos en esta Introducción, es clave no solo en la respuesta inflamatoria sino que también en el

desarrollo tumoral regulando la expresión de genes relacionados con la adhesión celular, proliferación y anti-apoptóticos, entre otros (Figura 4). Posteriormente, otros autores demostraron que también pueden interaccionar y promover significativamente la actividad transcripcional de otros factores de transcripción no esteroideos como la proteína de activación-1 (AP-1) [52], E2F [39] y STAT6 [43], entre otros. En resumen RAC3 coactiva también a muchos factores de transcripción no esteroideos.

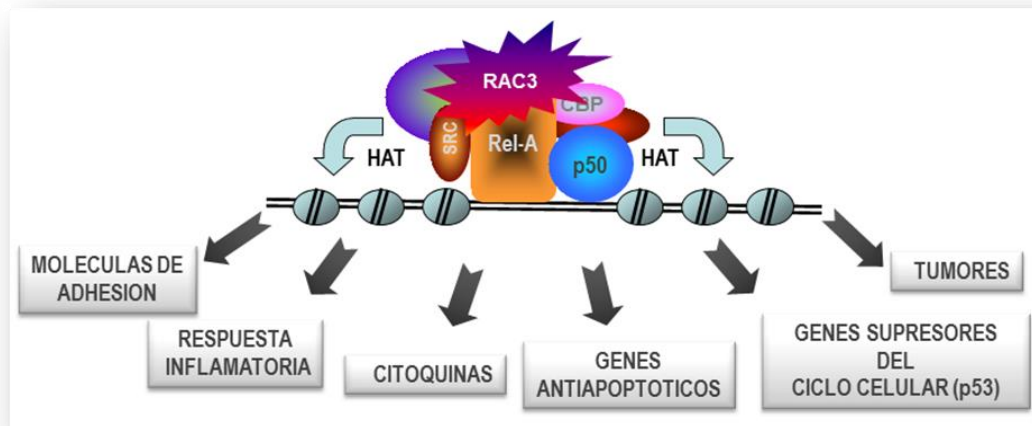


Figura 4. RAC3 es coactivador del Factor de transcripción no esteroideo NF- κ B [46].

II. iv. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE RAC3

La localización subcelular es un aspecto muy importante en el control de la actividad tanto de los NRs como de factores de transcripción y kinasas, ya que determina su posibilidad de interaccionar específicamente con otras moléculas y sustratos específicos y finalmente, la respuesta celular ante determinadas señales, pudiendo resultar por ejemplo, en la muerte celular o la supervivencia. En este contexto la actividad de RAC3 también es regulada por su localización subcelular y trafico intracelular.

Como se describió anteriormente RAC3 posee una secuencia bipartita de localización Nuclear (NLS) [53, 54] y su translocación nuclear es mediada

específicamente por la importina $\alpha 3$. En líneas generales RAC3 se encuentra translocando continuamente entre citoplasma y núcleo, pero se ha demostrado que su localización predominante es altamente dependiente del tipo celular y de su estado de diferenciación.

Muchos trabajos lo han descripto con una ubicación predominantemente nuclear en líneas celulares como HeLa (línea celular epitelial humana derivada de cáncer cervical), MCF-7 (línea celular epitelial de cáncer de mama humana), GH3 (línea celular tipo epitelial derivada de tumor pituitario de rata), COS-1 (línea celular tipo fibroblástica derivada de riñón de mono), CV-1 (línea celular fibroblástica derivadas de riñón de mono) ^[55], así como también en meningiomas ^[56] o tejidos de tumor de mama ^[57], entre otros.

Sin embargo, también se ha reportado su ubicación predominantemente citoplasmática, en tejidos del ratón en desarrollo, incluyendo páncreas, pulmones y músculo ^[48], mientras que el mismo grupo observó una tinción nuclear intensa en células de la granulosa del folículo que rodea el ovocito. Otros análisis sobre cortes de tejido a su vez también muestran un predominio en la localización citoplasmática de RAC3 ^[57, 58].

Al mismo tiempo, se ha demostrado la translocación de RAC3 al núcleo y su fosforilación por el complejo kinasa de I κ B (IKK) post-estímulo con TNF en células HeLa ^[9]. Otro estudio describe que en células fibroblásticas embrionarias de rata deprivadas de suero, RAC3 se halló principalmente en el citoplasma; mientras que al agregar insulina al medio translocó al núcleo. Esta redistribución puede ser bloqueada por el agregado de altas concentraciones de ácido okadaico, que inhibe a las fosfatasa 1 y 2 ^[14]. En suma, estas observaciones sugieren que la localización subcelular de RAC3 es regulada por receptores tirosina kinasa asociados a membrana como el receptor de insulina. De acuerdo con esto, también se demostró que el factor de crecimiento epidérmico (EGF) estimula la fosforilación de RAC3 e induce su localización nuclear ^[55].

Del mismo modo, estudios comparativos de la expresión de RAC3 en tejido normal de mama *versus* tejido mamario maligno, encontraron un aumento de la retención nuclear, con una disminución concomitante de RAC3 citoplasmática

cuando el epitelio normal progresa a un fenotipo más tumorigénico ^[57]. Otros trabajos igualmente afirman que la localización subcelular de RAC3 en la glándula mamaria es específica del grado de desarrollo y estado de malignidad ^[58]. También se ha reportado mediante el uso de un modelo de ratón transgénico de epitelio de mama se demostró que RAC3 es citoplasmática en células no proliferativas y nuclear en células en división ^[59].

II. v. MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DE RAC3

Las diferentes combinaciones de modificaciones post-traduccionales determinan la selectividad y actividad de los coactivadores y de esta manera pueden integrar múltiples señales que llevan a la fina regulación de la expresión génica. Por ejemplo la fosforilación de RAC3 por ácido retinoico y p38 aumenta su interacción con $RAR\alpha$, que luego es blanco de ubiquitinación y degradado terminando la transcripción ^[60]. Otro caso estudiado es la fosforilación de RAC3 en la Ser509 que prepara para la fosforilación en la Ser505 que así dispara la mono y subsecuente poli-ubiquitinación que activa y degrada a RAC3 respectivamente ^[61]. Otro caso es la fosforilación de RAC3 por las MAPK's inducida por estrógenos que inhibe la sumoilación de RAC3 o inversamente su desfosforilación aumenta la sumoilación disminuyendo la actividad de RAC3 ^[62].

a. ACETILACIÓN Y METILACIÓN: Uno de los mecanismos estudiados para modular la función de RAC3 es la acetilación por p300/CBP, que ocurre luego de la iniciación transcripcional. Su acetilación provoca el desarmado del complejo formado con los NR's y termina la transcripción [30]. También se ha demostrado que RAC3 es metilado por CARM-1 en la Arg1171 terminando la transcripción por desarmado del complejo y aumentando su degradación (Figura 5) [63].

b. FOSFORILACIÓN: Otro mecanismo estudiado es la fosforilación secuencial y la mono o poli-ubiquitinación que acopladas aseguran la terminación de la transcripción. Además, las fosforilaciones de RAC3 serían requeridas para una óptima interacción con los activadores transcripcionales y otros coactivadores, como CBP, Histona acetil transferasas o CARM-1 metil transferasa [64]. A su vez, existen evidencias de que las combinaciones de los sitios fosforilados serían responsables de la función diferencial de distintos factores de transcripción, y por lo tanto de sus diversas funciones fisiológicas. Por ejemplo se ha descrito la fosforilación de RAC3 en cinco sitios post-estímulo con TNF, mientras que el estímulo con estradiol provoca su fosforilación en seis [65].

Hasta el momento se han descrito ocho sitios de fosforilación en RAC3 que han demostrado ser funcionalmente importantes: Thr24, Ser505, Ser543, Ser601, Ser857, Ser860, Ser867 y Tyr1357 [65-67], asimismo en la fosforilación sitio específica de RAC3 están involucradas múltiples kinasas como p38, MAPK, JNK, IKKs y PKA [65], tal como se muestra en la Figura 3.

RAC3 es blanco en su Tyr1357 de la tirosin kinasa c-Abl activada por estrógenos y factores de crecimiento, aumentando su unión con p300 y los factores de transcripción ER α , PR y NF- κ B [66]. RAC3 también puede ser fosforilado por la kinasa atípica PKC en los aminoácidos 1031-1097 previniendo la interacción de RAC3 con la subunidad C8 del proteosoma [68]. Igualmente, se encontró a RAC3 asociado con la kinasa IKK, como se mencionó anteriormente [9].

Por otro lado, se demostró que la desfosforilación de RAC3 por las fosfatasa PDXP y PP2A inhibe su interacción con ER y reduce su actividad. Otro caso descrito es la fosfatasa PP1 que desfosforila a RAC3 en las Ser101 y 102 disminuyendo su actividad transcripcional y aumentando su estabilidad ^[69].

c. MARCAJE PARA LA DEGRADACIÓN: La degradación de RAC3 en algunos casos es mediada por la subunidad 26S del proteosoma que también media la función y turnover de los NR's (Figura 5) ^[70]. Se han descrito dos sitios de mono-ubiquitinación en las Lisinas 723 y 786 ^[61]. Contrariamente la fosforilación de RAC3 en la Ser505 por GSK-3 y en la Ser860 por p38 no solo aumenta la interacción del coactivador con ER y AR sino que también regula su estabilidad ^[60, 61].

Adicionalmente el activador del proteosoma REG γ puede estimular la actividad tripsina-*like* de la subunidad 20S del proteosoma, uniendo y promoviendo la degradación de RAC3 independientemente de ubiquitina y de ATP ^[71].

Otra modificación post-traducciona importante referida a RAC3 es la sumoilación (SUMO, *small ubiquitin related modifier*) que puede antagonizar la ubiquitinación de los SRC's por marcaje de un residuo de Lisina que es sustrato común con la ubiquitinación previniendo así la degradación del coactivador y aumentando su concentración, o bien cambiando a SRC en una conformación inactiva ^[71].

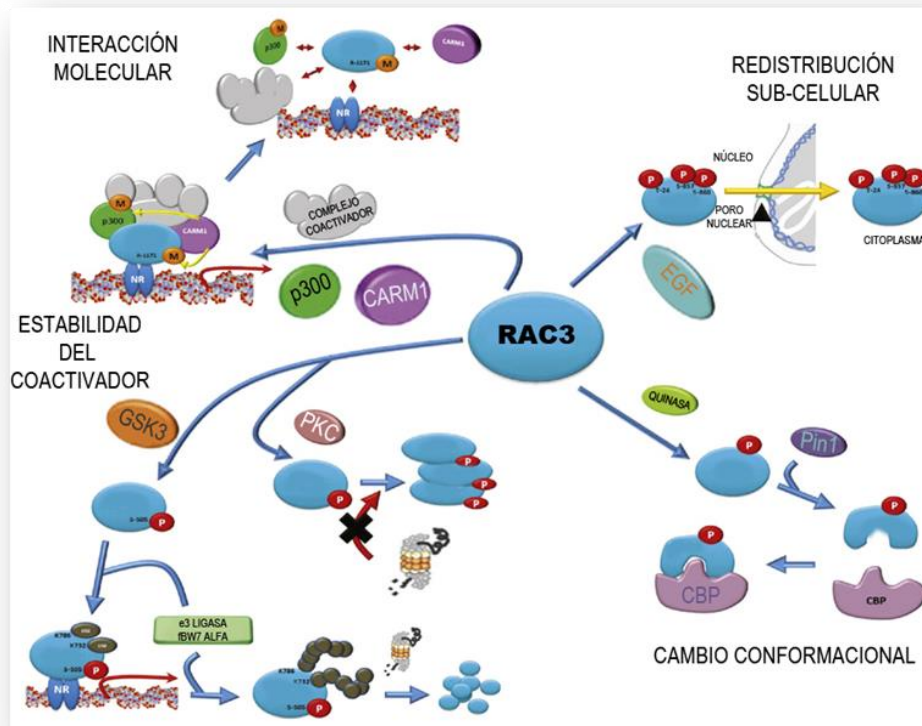


Figura 5. Modificaciones post-traduccionales de RAC3. *Modulación de la interacción molecular:* RAC3 es reclutado a regiones promotoras con NRs, P300 y CARM-1. Luego de la transcripción, CARM-1 metila a RAC3 y P300 disociando a RAC3 del complejo. *Redistribución subcelular* de RAC3. La fosforilación de RAC3 por el factor de señalización de crecimiento epidérmico (EGF) desencadena el tráfico subcelular de RAC3 para activar la transcripción. *Regulación de la estabilidad de RAC3.* En presencia de estradiol, RAC3 es fosforilado por la glucógeno sintasa quinasa 3b (GSK-3b) y luego secuencialmente ubiquitinado super-activando a ER. Cuando la cadena de ubiquitinas alcanza las 4-5 adiciones RAC3 es degradado por el proteasoma. En contraste, la fosforilación de RAC3 por la proteína quinasa C-z (PKCz) previene su degradación interrumpiendo la interacción con el proteasoma 20S. *Cambios Conformationales* RAC3 luego de ser fosforilada es reconocida por Pin-1 produciendo un cambio conformacional que aumenta su afinidad de interacción de CBP. Adaptado de Sang Jun Han, et. al. ^[72]

III. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NUCLEAR NF- κ B

La familia de factores de transcripción NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) comprende una variedad de proteínas que

poseen un dominio N-terminal de homología Rel (RHD) estructuralmente conservado. Mediante el RHD se produce la dimerización, la unión al ADN, la localización nuclear y la interacción con las proteínas inhibitorias I κ B.

La familia NF- κ B/Rel consta de cinco miembros: NF- κ B1 (p105/p50), NF- κ B2 (p100/p52), RelA (p65), c-Rel y RelB. (Figura 6). Estas subunidades se unen formando homodímeros o heterodímeros, excepto por RelB que solo forma heterodímeros. Por otro lado, la familia se subdivide de acuerdo a su región C-terminal del dominio RHD en clase I y II.

Los miembros de clase I incluyen a NF- κ B1 y 2 y poseen un dominio C-terminal con múltiples repeticiones de ankirina que actúan inhibiéndolas, por lo que para activarse deben sufrir un proceso proteolítico post-traducciona de degradación selectiva de esta región. Esta degradación da lugar a las subunidades maduras p50 y p52, respectivamente. Tanto p50 como p52 al no poseer dominios de transactivación (TAD) deben formar heterodímeros con miembros de la familia de clase II para poder activar la transcripción.

La familia de clase II incluye a las proteínas c-Rel, RelB y p65 (RelA) que son sintetizadas directamente como productos maduros; su región C-terminal contiene dominios TAD no homólogos entre sí que le permiten formar homodímeros o heterodímeros (excepto RelB). La composición de los dímeros depende del tipo celular, el estímulo, o del tiempo de respuesta tras la exposición al inductor ^[73, 74]. El heterodímero más ubicuo es el formado por RelA/p50. La Figura 6 esquematiza estos conceptos.

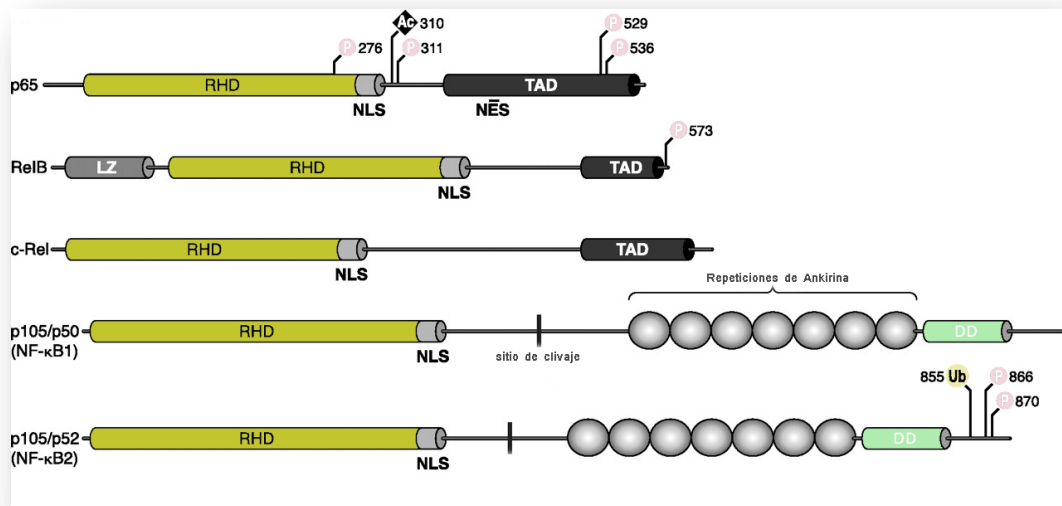


Figura 6. La familia de NF- κ B. AC: acetilación; Ub: ubiquitinación; TAD: dominio de transactivación; RHD: dominio de homología Rel; NES: etiqueta de exportación nuclear; NLS: etiqueta de localización nuclear; LZ: cremallera de leucina; DD: dominio de muerte. Adaptada de Nadine Bakkar, et. al., 2010 ^[75].

III. i. ACTIVACIÓN DE NF- κ B

Existen múltiples factores que pueden inducir a NF- κ B, entre ellos citoquinas inflamatorias como TNF ^[76], IL-2, IL-1; mitógenos, factores de crecimiento ^[77, 78], hormonas ^[79], situaciones de estrés, hipoxia ^[80], lipopolisacárido bacteriano (LPS) ^[81], virus y otros factores como luz UV, peróxido de hidrógeno ^[80] (Figura 8).

Se dice que NF- κ B es un factor inducible, ya que se encuentra mayormente retenido en forma inactiva en el citoplasma a través de su asociación con proteínas de la familia I κ B cuyos miembros son: I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ . Estas proteínas inhibitorias se caracterizan por tener múltiples repeticiones de ankirina que median la unión con el RHD del factor de transcripción y con otras proteínas. De esta manera, cuando la célula recibe una señal activadora, I κ B se degrada rápidamente permitiendo que NF- κ B migre al núcleo y active la expresión génica.

Debido a que la activación de NF- κ B no requiere síntesis *de novo* la respuesta se produce rápidamente.

En el caso de RelA (p65) se ha comprobado que I κ B α enmascara su secuencia de translocación nuclear (NLS), dejando expuesto el NLS de p50 ^[82]. NLS expuesto y acoplado con la secuencia de exportación nuclear (NES) presente tanto en I κ B α como en RelA, resulta en un constante transporte entre núcleo y citoplasma del complejo formado por RelA/p50/I κ B α . Como el proceso de exportación es mucho más potente que el de importación, la localización de NF- κ B unido a I κ B α es citoplasmática (un mecanismo similar es utilizado por I κ B ϵ). En el caso de I κ B β que carece de NES logra que NF- κ B permanezca en el citoplasma en ausencia de estímulo enmascarando ambos NLS de NF- κ B.

Debido a la actividad ubicua de NF- κ B, debe existir un control temporal y específico de su respuesta. En este sentido, diferentes estímulos activan distintas kinasas, que son capaces de marcar diferencialmente a I κ B para su degradación. Además, los miembros de I κ B tienen distintas afinidades por los dímeros NF- κ B, por ejemplo I κ B α tiene mayor afinidad por RelA/p50. A su vez, un determinado gen blanco requiere de miembros específicos de esta flia. para su expresión. De acuerdo con esto, se han descrito distintas vías de activación de NF- κ B agrupadas en dos principales: canónica y no canónica. En líneas generales todas consisten en la activación secuencial de kinasas, la degradación de un inhibidor, la liberación de dímeros activos de NF- κ B, su ulterior unión al ADN, y finalmente el aumento de la actividad transcripcional del factor NF- κ B (Figura 7).

a. VÍA CANÓNICA: Sus principales activadores son LPS, citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β y TNF, entre otros.

Si bien los eventos tempranos seguidos a la interacción del ligando con su receptor son específicos para cada estímulo ^[83], las señales iniciadas convergen en IKK, que incluye a IKK γ /IKK α /IKK β que una vez activa fosforila a I κ B α en las Ser32 y Ser36 ^[84] marcándolo para el reconocimiento por la maquinaria de ubiquitinación por el complejo SCF- β -TrCP y degradando a I κ B α

por la vía del proteosoma 26S. La degradación de $I\kappa B\alpha$ desenmascara la NLS de NF- κ B haciendo que transloque al núcleo. Estudios realizados *in vitro* e *in vivo* indican que tanto IKK α como IKK β son capaces de fosforilar a $I\kappa B\alpha$, aunque el papel de IKK β es mucho más potente en la fosforilación inducida por estímulos inflamatorios. Asimismo IKK α tiene un amplio espectro de funciones no compartidas con IKK β , como fosforilación de histonas ^[85], de CD1 ^[86], de RelA y c-Rel que participan en la terminación de la activación de NF- κ B ^[87] y está involucrada en la activación de la vía no canónica ^[88]. La actividad del complejo IKK es regulada por fosforilación e IKK γ o NEMO (NF- κ B *essential modulator*) que sería la subunidad regulatoria del complejo.

Por otro lado, el mismo NF- κ B “reprime” su activación ya que se une a sitios en el promotor del gen de $I\kappa B\alpha$, activando la síntesis de su inhibidor ^[89].

En el caso de p50 producto del procesamiento constitutivo del precursor p105 (NF- κ B1), necesario para la actividad basal de NF- κ B, existe un procesamiento inducible que depende de la fosforilación mediada por la IKK y la ubiquitinación de p105 que puede ocurrir en respuesta a citoquinas pro-inflamatorias y LPS ^[90]. El procesamiento de p105 puede ser producto de dos procesos distintos que emplean diferentes ubiquitin ligasas y que pueden marcar a p105 ya sea para su completa degradación o para su procesamiento parcial necesario en esta vía ^[91].

b. VÍA NO CANÓNICA: Esta vía es activada por la unión a sus receptores específicos de linfotoxina B, o el factor de activación de células B (BAFF), RANK ligando o el ligando CD40, entre otros (que también pueden activar la vía canónica). La vía no canónica es independiente de IKK γ e IKK β y la kinasa responsable de mediar la activación es un homodímero formado por IKK α que sería fosforilada por la kinasa NIK (NF- κ B inducing domain). IKK α fosforila a p100 asociada a RelB, marcando a p100 para el procesamiento por el proteosoma y da lugar al complejo transcripcionalmente activo p52/RelB que transloca al núcleo ^[88].

c. VÍA DE ACTIVACIÓN POR DAÑO AL ADN: Esta vía es considerada atípica dado que no se inicia con la unión de un ligando a su receptor. NF- κ B es activado como producto del estrés genotóxico como la irradiación ultravioleta (UV) que conduce a la translocación de NEMO (IKK γ) al núcleo donde es sumoilado y posteriormente ubiquitinado en un proceso mediado por la kinasa ataxia telangiectasia mutada (ATM). NEMO y ATM pueden regresar al citosol donde activan IKK β ^[92].

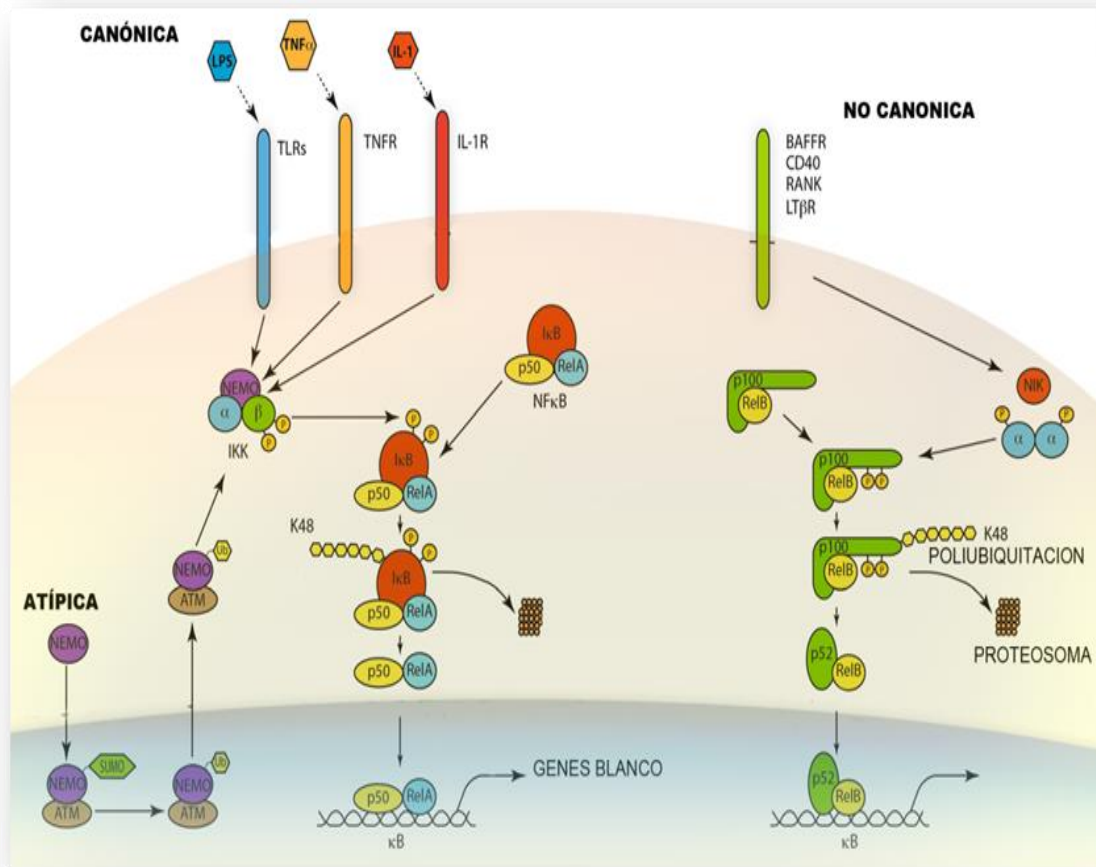


Figura 7: Vías de activación de NF-κB. La vía canónica es activada por señales inflamatorias como citoquinas pro-inflamatorias y LPS bacteriano, estas señales activan el complejo IKK y la degradación de IκBα. El complejo NF-κB liberado (RelA/p50) transloca al núcleo donde activa la transcripción de sus genes blanco. La vía no canónica es activada por algunos miembros de la familia de Receptores de TNF que incluyen LTβR, BAFF y CD40L y lleva al procesamiento del precursor p100 y la liberación del complejo p52/RelB. La vía atípica activada por estrés genotóxico conduce a la translocación de NEMO al núcleo donde es sumoilado y posteriormente ubiquitinado mediado por la ataxia telangiectasia mutada (ATM). Adaptado de Bastian Hoesel, et. al. ^[92]

La actividad transcripcional de NF-κB es regulada además por correguladores, algunos de los cuales también interaccionan con NRs. Dentro de

los coactivadores podemos nombrar a p300/CBP, p/CAF, y, como hemos demostrado en el año 2000, RAC3 ^[46, 93-95].

En el caso de los miembros del complejo IKK su activación depende mayormente de su fosforilación, por ejemplo la sobre-expresión de la Proteína Fosfatasa 2A (PPA2) inhibe su activación, mientras que el tratamiento con ácido okadaico (inhibidor de PPA2) aumenta la activación del complejo ^[96].

Finalmente, la actividad de los distintos miembros de la familia NF- κ B es regulada por una variedad de modificaciones post-traduccionales, como fosforilación, acetilación, ubiquitinación e isomerización de Prolinas. Por ejemplo, la acetilación en las Lisinas 218, 221, 310 de RelA activa a NF- κ B inhibiendo su unión con I κ B α ^[97]; mientras que la acetilación en la Lys122 y 123 reprime su capacidad transcripcional reduciendo su unión al ADN ^[98].

III. ii. GENES BLANCO DE NF- κ B

NF- κ B es capaz de inducir una gran variedad de genes que además están involucrados en una multiplicidad de respuestas como la respuesta inmune, apoptosis, proliferación, migración, adhesión celular, angiogénesis y el desarrollo, entre otros. Algunos ejemplos pueden ser aquellos que codifican para citoquinas, factores de crecimiento, proteínas de respuesta de fase aguda, moléculas de adhesión, otros factores de transcripción y varios reguladores de la apoptosis. Además NF- κ B está involucrado en la expresión de genes de respuesta temprana involucrados en la interacción célula-célula, comunicación intercelular, trans migración y en la iniciación de la tumorigénesis (Figura 8) ^[99].

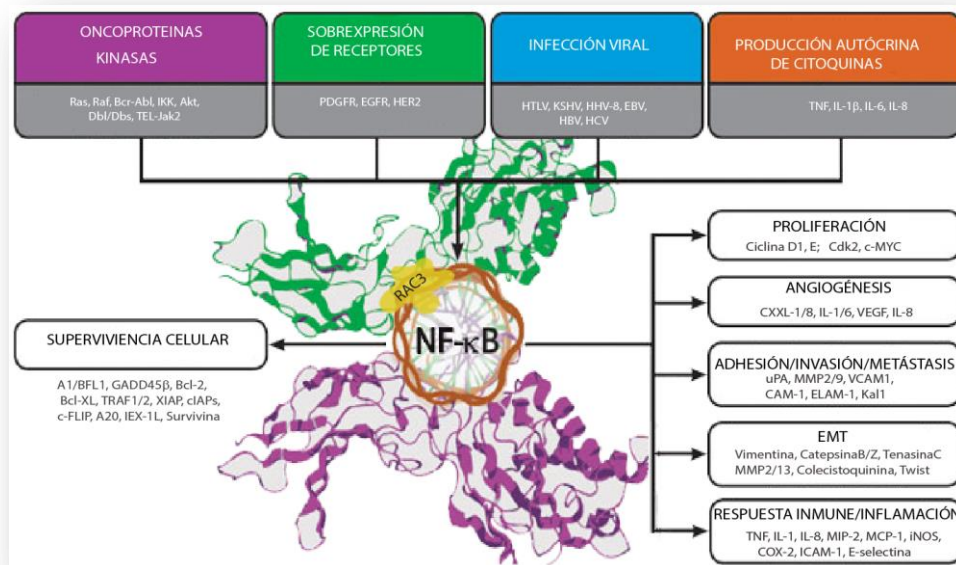


Figura 8. Genes blanco de NF-κB y las vías en las que están involucrados. Adaptado de

Sethi G, et. al., 2008 ^[100].

III. iii. INDUCCIÓN DE NF-κB POR LA CITOQUINA TNF

TNF es una citoquina pleiotrópica implicada en la regulación de variadas y numerosas respuestas biológicas como la modulación del crecimiento celular, apoptosis, inflamación, tumorigénesis, diferenciación, shock séptico y autoinmunidad ^[101].

TNF es un potente activador de NF-κB, y media su función a través de la interacción con sus receptores. La decisión final de la respuesta será resultado del balance entre las vías activadas cuando TNF se une a su receptor. La activación de NF-κB puede ser primordial en el resultado final; por ejemplo el bloqueo de la función de este factor muestra una marcada sensibilización a la apoptosis celular inducida por TNF ^[102, 103].

Se han caracterizado dos receptores de membrana para TNF: TNFR1 o p55 y TNFR2 o p75. TNFR1 se expresa de forma ubicua en el sistema linfóide y en casi todas las células del cuerpo, mientras que TNFR2 se expresa en ciertas

poblaciones de células del sistema inmune ^[104, 105], del SNC (sistema nervioso central) ^[106, 107], células endoteliales, y células madre mesenquimales humanas ^[108], entre otros. Tanto TNFR1 como 2 muestran una estructura similar en el dominio extracelular ^[109] y diferente en el intracelular.

Si bien TNF depende tanto de TNFR1 como de TNFR2 para la apoptosis y para cualquier función relacionada con la supervivencia celular en la mayoría de las células la activación de NF- κ B ocurre a través de TNFR1 ^[110, 111]. La unión de TNF que activa a NF- κ B induce la homotrimerización de los receptores y recluta la proteína con dominio de muerte asociada al TNFR1 (TRADD) ^[112] al dominio citoplasmático de muerte de TNFR1. El complejo se completa con la proteína de interacción del receptor 1 (RIP1) y el factor asociado a TNFR 2 (TRAF2) ^[113] haciendo que finalmente el inhibidor de NF- κ B sea fosforilado por la proteína quinasa adaptadora activada por TGF (TAK1), la quinasa inductora de NF- κ B (NIK) o la MAPK quinasa quinasa MEKK3 desencadenando su disociación de NF- κ B (Fig. 9) ^[114]. Por otro lado la unión de TNF a TNFR1 que contiene en su dominio intracitoplasmático un dominio de muerte que se une a TRADD y al dominio de muerte asociado a Fas (FADD) desencadena la apoptosis.

A su vez, si bien TNFR2 carece de dominio de muerte, es capaz de inducir apoptosis además de activar a NF- κ B, y ambos mecanismos estarían mediados por TRAF2, dado que este es capaz de asociarse y secuestrar proteínas con rol anti-apoptótico, como miembros de la familia IAP ^[115].

Debido a la diversidad de respuestas que pueden desencadenar ambos receptores la expresión ubicua de TNFR1 respecto de TNFR2 conlleva a que la relación de su co-expresión se desplazará entre la supervivencia celular y la apoptosis

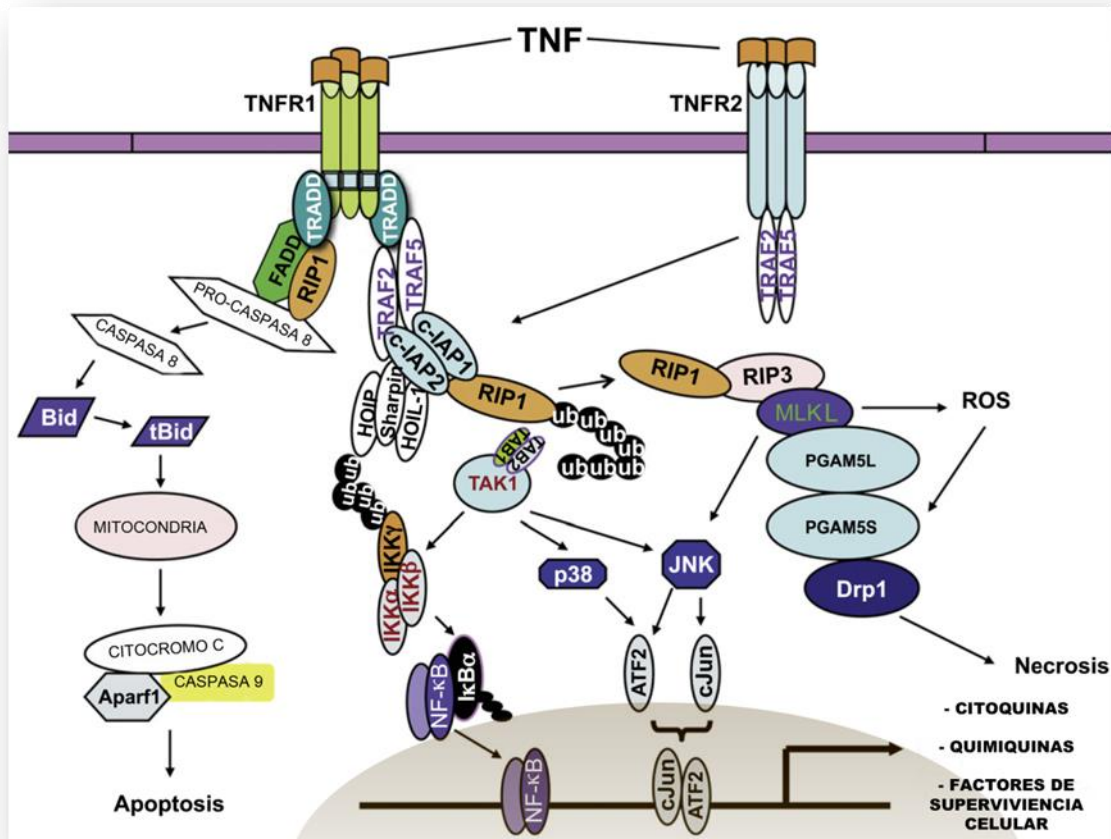


Figura 9. Modelo de señalización de TNF: TNF se une a TNFR1 y TNFR2. TNFR1 interactúa con TRADD a través de su dominio de muerte (DD) y recluta a TRAF2, TRAF5 y c-IAP1/2. Luego se recluta RIP1 que es ubiquitinado. RIP1 poli-ubiquitinilado desencadena la activación TAK1, que a su vez activa IKK α/β , JNK y p38 activando a NF- κ B y AP-1 que se unen al ADN blanco. TNFR1 también utiliza TRADD para reclutar a FADD y RIP1 no ubiquitinado. FADD y RIP1 interactúan con la pro-caspasa, que se activa, caspasa 8 cliva a Bid a tBid, que entra a las mitocondrias disminuyendo el potencial de membrana liberando el citocromo c. El citocromo c con Apaf1 y caspasa 9, forman el apoptosoma que desencadena la apoptosis. Además, RIP1 no ubiquitinado puede interactuar con RIP3 y conducir a la necrosis. Adaptado de Wen-ming Chu, 2013 ^[116].

IV. LA RESPUESTA INFLAMATORIA

La inflamación es un mecanismo de defensa crucial contra la infección o de respuesta a lesiones intra o extracelulares que involucra la activación de múltiples mediadores con el fin de remover el agente causal del daño y sus restos para

luego restablecer al tejido a su estructura y función normal. Fisiológicamente se caracteriza por síntomas “cardinales” como inflamación marcada y localizada, enrojecimiento, dolor, calor y pérdida de función. Una vez activada se pueden desarrollar dos tipos de respuesta: innata y adaptativa.

El sistema inmune innato es crítico para la respuesta inicial y se activa inmediatamente después de la detección de estructuras evolutivamente conservadas conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o patrones moleculares asociados a daños (DAMPS) ^[117]. La inflamación crónica en el sitio de invasión es iniciada por las células residentes del sistema inmune innato vía receptores de reconocimiento tipo Toll-*like* (TLRs), Nod-*like* o miembros de la flia. I inducible por ácido retinoico o bien por citoquinas inflamatorias como TNF e IL-1 ^[118, 119] que se unen a sus receptores específicos. Los TLRs reconocen a moléculas como LPS, peptidoglicanos y ácidos nucleicos simple y doble cadena, además de proteínas de membrana comunes en bacterias ^[120]. Estas señales terminan activando factores de transcripción como AP-1 y NF- κ B y la flia. IRF ^[121], que para dar respuesta desencadenan la expresión de sus genes blanco como citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias y moléculas de adhesión propagando la inflamación y activando cascadas de señales de factores intermediarios y kinasas.

Por otro lado, la respuesta adaptativa actúa como una segunda línea de defensa y se trata de una respuesta celular que involucra la expansión de células T y B específicas de antígeno que neutralizan y eliminan eficazmente patógenos y al mismo tiempo ayudan a formar la memoria inmunológica ^[122]. Este incremento y liberación de mediadores es fundamental para la progresión de la respuesta inflamatoria ^[123] y si se ha logrado combatir la causa o lograr la limpieza de patógenos los fibroblastos proliferan para el restauramiento tisular.

Si bien se trata de una respuesta de defensa, la producción excesiva de citoquinas puede resultar en daño sistémico del tejido, falla orgánica múltiple e incluso la muerte. En este sentido, existen condiciones patológicas consecuencia de la inflamación crónica como asma, aterosclerosis y enfermedades autoinmunes

como artritis reumatoidea o lupus que son caracterizadas por una sobreproducción característica de citoquinas ^[124].

En consecuencia la inmunidad y la inflamación son procesos fisiológicos de gran importancia en el organismo, donde el mantenimiento de la homeostasis inmune es crítico para la supervivencia del organismo.

IV. i. RAC3 EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA

RAC3 cumple un rol muy importante en la respuesta inflamatoria, tal como demuestra la creciente evidencia en las últimas décadas. El hecho de que RAC3 sea coactivador de factores de transcripción claves en la respuesta pro- y anti-inflamatoria como NF- κ B ^[46], GR, AP-1 y PPAR ^[125], sugería que pequeños cambios en sus niveles de expresión o activación podrían repercutir significativamente en los procesos inflamatorios.

En investigaciones realizadas con ratones RAC3^{-/-} se observó un aumento en el grado de infecciones de piel y ojos con respecto a los *wild type*, indicando cierta discapacidad en el sistema inmune de estos animales ^[38].

En el año 2002, otros autores encuentran que la I κ B kinasa (IKK) clave en la activación de la vía de NF- κ B, se asocia exclusivamente con RAC3, entre los miembros de la flia. p160. Además, demuestran que el aumento en la actividad transcripcional de NF- κ B por RAC3 se hace en conjunto con la IKK y que RAC3 es fosforilado *in vitro* por IKK α e IKK β . A su vez, también demuestran el aumento en la translocación nuclear de RAC3 en respuesta al tratamiento con TNF *in vivo* y en células que sobre-expresan RAC3 un aumento en la expresión de caspasas pro-inflamatorias, mientras que ven la disminución en los niveles de expresión del gen blanco de NF- κ B IRF-1 (factor regulador de interferón 1) en el bazo de ratones RAC3^{-/-} ^[9].

Luego, otros trabajos muestran que RAC3 es un factor importante en la protección fisiológica frente al shock endotóxico letal en la respuesta inflamatoria aguda. En este trabajo los ratones RAC3^{-/-} son notablemente más sensibles al

shock endotóxico inducido por LPS, y si bien los macrófagos RAC3^{-/-} poseen cantidades similares de ARNm de citoquinas, producen significativamente más citoquinas pro-inflamatorias como TNF, IL-6, e IL-1 β que los control, sugiriendo que los niveles de RAC3 pueden modificar los niveles de estas citoquinas pero sorprendentemente a nivel traduccional donde además que ven el aumento de los polisomas pesados asociados a los ARNm de TNF e IL-1 β . Este trabajo es muy importante, no solo porque describe el rol de RAC3 en la respuesta inflamatoria, sino que lo hace con un rol citoplasmático y reprimiendo la traducción por un mecanismo de cooperación con otros represores traduccionales como TIA-1 y TIAR para regular la traducción del ARNm de citoquinas ^[14].

Posteriormente, el mismo grupo encuentra que RAC3 también es fundamental en la modulación de la inflamación local y sistémica en ratones RAC3^{-/-} a los que se indujo peritonitis. Los ratones *knockout* mostraron respuestas inflamatorias locales y sistémicas excesivas con elevada carga bacteriana, al mismo tiempo que su mortalidad fue significativamente mayor en comparación con los ratones *wild type* ^[126]. Además observaron que los macrófagos peritoneales de estos ratones disminuyeron la fagocitosis bacteriana en cultivo y aumentaron la apoptosis (consistente con la eliminación bacteriana) expresando bajos niveles del *scavenger receptor A*, la enzima antioxidante catalasa y el gen anti-apoptótico Bcl-2.

Seguidamente, otro grupo de trabajo, demuestra que RAC3 también es un regulador importante en el desarrollo de la inmunosupresión que acompaña al SRIS (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica). Este grupo nuevamente observa que la ausencia de RAC3 daña el sistema inmune innato, y la capacidad del cuerpo para inactivar o fagocitar bacterias ^[127]. Pero, por otro lado encuentran que en ausencia de RAC3 post-quemadura Sever los niveles de IL-2 en plasma son significativamente menores que en los ratones de *wild type*, mientras que los niveles de sIL-2R (soluble) son significativamente mayores, indicando que la ausencia de RAC3 puede agravar la inmunosupresión de células T. Resulta interesante que este trabajo revela que en ausencia de RAC3 el estado de equilibrio de los subgrupos de linfocitos destruidos que conduce a la supresión de

la respuesta inmune celular post-fenómeno inflamatorio sistémico fue más grave, ya que disminuyeron los niveles de CD3+ (*cluster* de diferenciación 3) en sangre periférica, bazo, timo y de CD4+ en el bazo de ratones RAC3^{-/-}; mientras que aumentaron significativamente los niveles de CD8+ en sangre periférica y bazo de los ratones RAC3^{-/-} respecto a los ratones *wild type*^[128].

V. GLUCOCORTICOIDES

Los glucocorticoides (CGs) son hormonas esteroideas que pertenecen a la familia de los corticosteroides. Los CGs regulan el metabolismo de la glucosa, la deposición de glucógeno en el hígado, la presión arterial y están involucrados en el metabolismo lipídico, el ritmo circadiano, la reproducción y la reabsorción de calcio^[129]. También se han descrito efectos de los CGs en el comportamiento y la función cerebral^[130] pero una de sus funciones más importantes es la modulación dinámica de las respuesta inflamatoria e inmune.

Con el objeto de controlar la hiperactivación del sistema inmune o infecciones sistémicas los CGs pueden afectar a casi todas las células del sistema inmune^[131], a nivel transcripcional como celular. Por ejemplo, los CGs bloquean la expresión de la ciclooxygenasa-2 (COX-2), controlando la hiperactivación consecuencia del exceso de unión al receptor de células T (TCR) o superantígeno^[132, 133]. Además afectan la expresión de receptores de citoquinas, la regulación y selección de funciones de linfocitos B de supervivencia y la interferencia con la eritropoyesis^[134-137]. Los CGs influyen en la estabilidad de los ARNm de la respuesta inflamatoria a través de la inducción de la tristetraprolina (TTP) que provoca la desestabilización del ARE-ARNm de citoquinas como TNF^[138].

Sin embargo, aunque los CGs son claramente anti-inflamatorios en situaciones de inflamación en curso, su rol en la fisiología normal del sistema inmune es menos conocido. En este sentido y en lo que respecta al menos al sistema inmune innato los CGs no son estrictamente inmunosupresores^[139]. Por ejemplo los CGs inducen la expresión de TLR2, que además se ve reforzada por la presencia de citoquinas pro-inflamatorias cuyo aumento en células epiteliales

aumenta la secreción de IL-6 e IL-8 críticas para la inducción de la respuesta de fase aguda y la quimiotaxis de una gran variedad de células ^[121]. Contrariamente, la inducción de TLR2 (y TLR4) dentro de la glándula suprarrenal está directamente involucrada en la liberación de cortisol y la corticosterona ^[121], proporcionando un bucle de retroalimentación positivo para la resolución del proceso inflamatorio. De esta manera el equilibrio entre los efectos pro- y anti-inflamatorios de los CGs en respuesta a la infección dependerá de la fase de la respuesta o contexto fisiológico en la que se introducen los CGs. Además, la regulación y la acción de los efectos de los GCs también dependen de factores específicos de tejido, de la biodisponibilidad de la hormona, y de sus enzimas modificadoras.

V. i. EL EJE HPA

Está claro que la respuesta inflamatoria debe atenuarse para no constituir un daño intrínseco para el hospedador, es por ello que son numerosos los mecanismos que controlan la expresión y actividad de los mediadores pro-inflamatorios espacial y temporalmente.

Localmente, el estímulo inflamatorio induce la expresión de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10, factores que desestabilizan el ARNm de citoquinas y blancos de microARNs en varias etapas de la producción y señalización de citoquinas pro-inflamatorias ^[140].

Por otra parte, cuando la respuesta local falla en contener la reacción inflamatoria, las mismas citoquinas pro-inflamatorias circulantes y las fibras vagas aferentes activan al eje Hipotálamo-Pituitario-Adrenal (HPA). En el eje HPA, la síntesis y secreción de los CGs antagonizan la respuesta inflamatoria en gran parte vía su receptor específico GR. La síntesis y secreción de los CGs está estrechamente controlada por el equilibrio de la hormona adrenocorticotrofina (ACTH), secretada por la glándula pituitaria anterior y de corticotrofina (CTH), secretada por el hipotálamo durante el estrés de manera pulsátil y circadiana ^[141]. De esta manera la ACTH incrementa la liberación de cortisol de las glándulas

adrenales como se muestra en la Figura 10. Además, existen otros factores que también pueden estimular liberación de ACTH como vasopresina, serotonina, angiotensina, etc. ^[142].

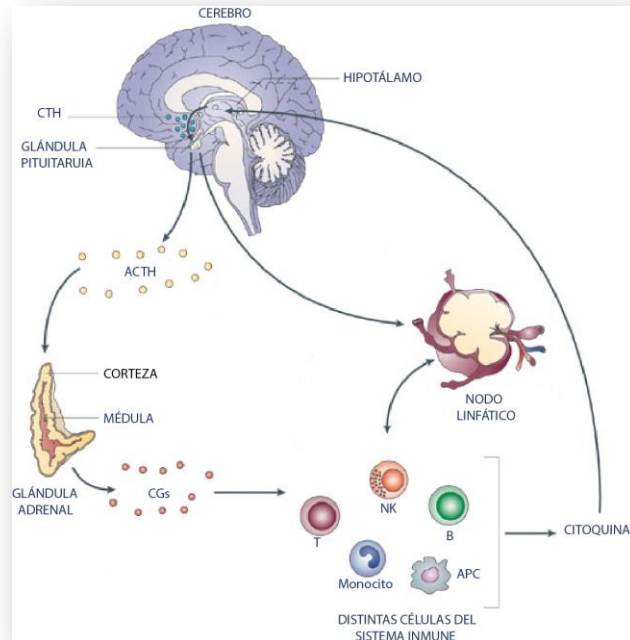


Figura 10. Modelo esquemático del eje HPA. CTH: hormona corticotrofina, ACTH: hormona adrenocorticotrofina; CG's: glucocorticoides; NK: *natural killers*; APC: célula presentadora de antígeno. Adaptado de Ronald Glaser and Janice K. Kiecolt-Glaser, 2005 ^[143].

V. ii. EL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES (GR)

El receptor de CGs (GR) es una proteína de 94KDa que consta de 9 exones, y pertenece a la familia de receptores de hormonas esteroideas, que comprenden proteínas de estructura similar al receptor de progesterona (PR) y de mineralocorticoides (MR), entre otros, que a su vez pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares (NRs) ^[144].

La expresión del GR está regulada por al menos tres promotores diferentes A, B y C y a su vez el promotor "A" utiliza alternativamente tres fragmentos promotores únicos 1A1, 1A2 y 1A3 ^[145]. De manera que pueden existir cinco

transcripciones de diferentes promotores que codifican las mismas proteínas GR. Además de los transcriptos alternativos existen dos variantes producto del *splicing* alternativo. Por lo tanto, el gen de GR genera diez transcripciones diferentes que codifican dos moléculas de proteína, GR α y GR β . Si bien GR se expresa diferencialmente en varias líneas celulares y tejidos diferentes ^[146], GR α es el receptor clásico que se expresa de forma ubicua y media la mayoría de las acciones conocidas de los CGs ^[136].

En general, los miembros comparten un dominio de transactivación variable (TAD) o función de activación 1 N-terminal (AF-1) responsable de la activación de la transcripción y la asociación con ciertos factores de transcripción basales ^[147], un dominio central y bien conservado de unión al ADN (DBD) (*DNA binding domain*) que consta de dos iones de zinc coordinados con ocho residuos de cisteína para formar dos dedos de zinc (Figura 11). GR se une a sus sitios blanco en el ADN mediante el dedo de zinc de N-terminal relacionado con la interacción específica con el ADN, mientras que el dedo de zinc C-terminal provee la dimerización ADN-dependiente ^[148]. El DBD discrimina entre diferentes elementos de respuesta y determina qué genes se activan por aminoácidos cruciales localizados en la parte C-terminal del dedo de zinc llamada P-box ^[149]. Finalmente posee un dominio C-terminal moderadamente conservado responsable de la unión del ligando LBL (*ligand binding domain*) que también posee funciones de transactivación (AF-2) ^[150].

Las regiones de transactivación 1 y 2 son importantes para la interacción con coactivadores y correpresores. Además de los ligandos de GR, las diferentes secuencias de unión de GR al ADN pueden afectar diferencialmente su conformación y actividad reguladora, como tal, el ADN puede ser considerado un ligando alostérico secuencia específico de GR ^[151].

En las proximidades del DBD y al final del LBD se localizan dos sitios de localización nuclear: uno ligando independiente NL1 y el otro dependiente de ligando NL2 que dirigen a GR activado al núcleo ^[152] (Figura 11).

En su estado de reposo sin ligando (ausencia de GC), GR está presente en el citoplasma formando parte de un complejo inactivo con chaperonas y moléculas

co-chaperonas ^[153]. Como las proteínas de choque térmico o HSP (Hsp90 y Hsp70); cuya acción es regulada positiva o negativamente por co-chaperonas como inmunofilinas (proteínas de unión a FK506 FKBP1/2), dineína y p23, entre otras ^[154].

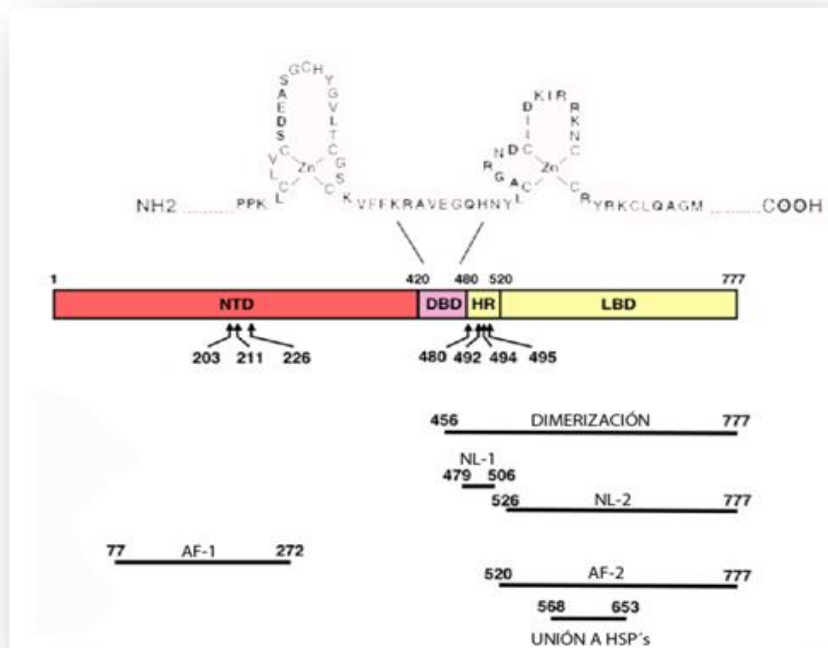


Figura 11. Principales dominios del receptor de Glucocorticoides (GR). AF-1 y 2: funciones de transactivación, NL-1 y 2: sitios de localización nuclear; HSP's: flia. de proteínas chaperonas (*heat shock proteins*); NTD: dominio N-terminal; DBD: dominio de unión al ADN; LBD: dominio de unión a ligando; HR: región bisagra.

V. iii. ACTIVACIÓN DE GR POR GLUCOCORTICOIDES (GCs)

Una vez que alcanzan su objetivo celular, los GCs, por su naturaleza liposoluble pueden atravesar la membrana plasmática e ingresar en la célula ^[155].

La unión de los GCs desencadena un cambio conformacional en GR que resulta en la disociación del heterocomplejo. La hiperfosforilación de GR inicia la sustitución de la inmunofilina (FKBP-51) por otra (FKBP-52), el reclutamiento concomitante de la proteína de transporte dineína, y la exposición de las señales

de localización nuclear provocando su translocación al núcleo mediada por importina ^[156]. Luego, la ubicación de GR es determinada por la señal de retención nuclear (NRS), que configura activamente a GR en el núcleo ^[157]. GR en el núcleo, dimeriza y se une directamente a GRE estimulando la expresión de sus genes blanco ^[158].

Tanto la naturaleza del ligando unido como la secuencia GRE en sí pueden dictar el montaje y la función de los cofactores específicos a través de alteraciones en la estructura del receptor ^[159, 160]. GR interactúa brevemente con sus genes blanco con un rápido ciclo, dentro y fuera del GRE que dura pocos segundos ^[161].

Se han descrito tres clases de sitios blanco GRE: la simple palindrómica compuesta por dos hexámeros invertidos específicos (AGAACA) separados por un enlazador de 3pb a la que solo se une GR y generalmente como un homodímero; secuencias GRE compuestas que proporcionan una superficie de unión para GR junto con a otro regulador y no pueden parecerse a la secuencia de los sitios de unión convencionales para cualquiera de las partes y por último la secuencia "GRE *Tethering*" que son elementos para otros factores de transcripción como AP-1 o NF- κ B, a la que GR es reclutado a través de interacciones proteína-proteína como se muestra en la Figura 12.

Aunque GR puede activar o reprimir la transcripción de GRE de los tres tipos mencionados, la unión de GR a una GRE simple conduce a la activación transcripcional, mientras que el reclutamiento GR a los sitios "GRE *thetering*" típicamente conduce a la transrepresión como discutiremos más adelante.

Una vez activado, varios mecanismos se ponen en movimiento para interrumpir la respuesta de GR. Por ejemplo la regulación negativa de la expresión del ARNm de GR por los CGs ^[162] lo cual podría explicarse por la presencia de elementos de respuesta GC negativos (nGRE), o de etiquetas de pegado para AP-1, NF- κ B y CREB en el promotor de GR ^[163]. Por último, se demostró que la degradación de GR está ligada a su exportación.

V. iv. TRANSREPRESIÓN MEDIADA POR GR

Si bien GR es capaz de interactuar con y alterar la actividad transcripcional de otros factores potencialmente implicados en la respuesta inflamatoria como el factor regulador del interferón (IFN) 3 (IRF3) ^[138] y GATA3 ^[164], entre otros ^[165], los mecanismos de transrepresión con AP-1 y NF- κ B son los más caracterizados. AP-1 es uno de los principales mediadores de la respuesta inflamatoria, funciona como un homo o heterodímero, y la forma más común de AP-1 río abajo de la señalización por citoquinas inflamatorias es el heterodímero c-Jun/c-Fos ^[166] que una vez activado regula numerosos genes pro-inflamatorios. En el modelo clásico de la inhibición mediada por GR, la actividad de AP-1 se suprime como resultado de una interacción directa con la subunidad c-Jun de AP-1, lo que resulta en el antagonismo recíproco de la señalización mediada por GR ^[167] (Figura 12).

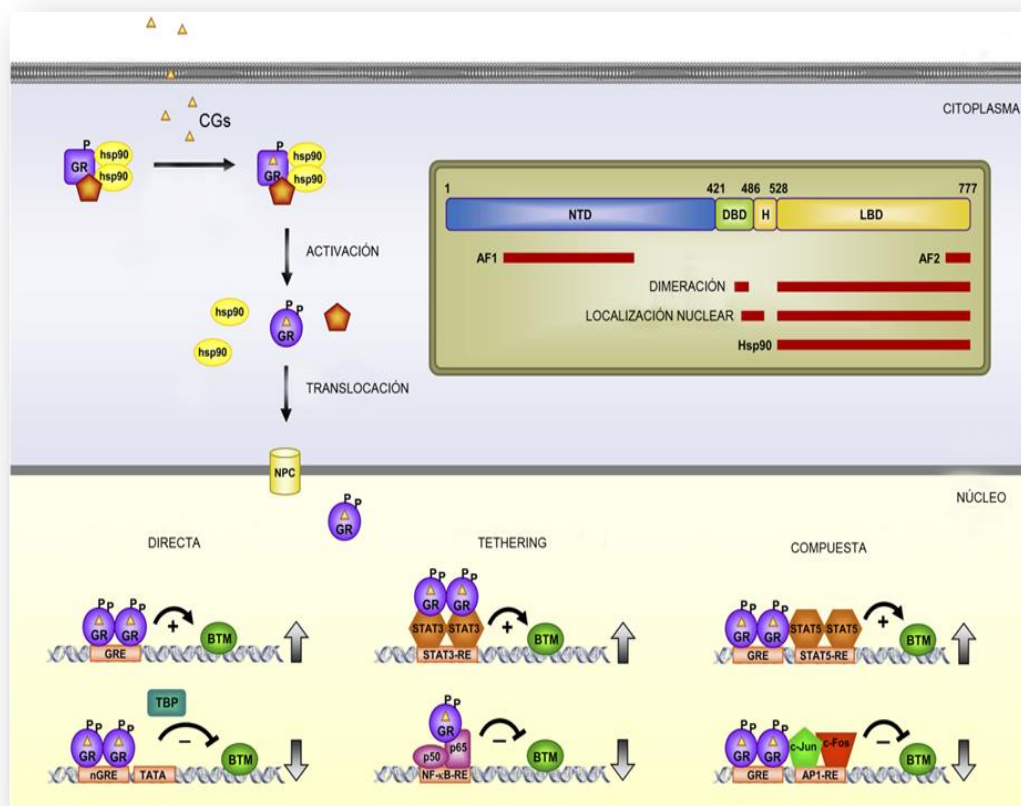


Figura 12. Vía de señalización de GR. Ante la unión de CGs, GR citoplasmático sufre un cambio conformacional, se hiperfosforila (P), y se disocia de proteínas accesorias, translocando al núcleo. GR mejora o reprime la transcripción de sus genes blanco por unión directa a GRE Mediante la inmovilización de sí mismo a otros factores de transcripción, o de una manera compuesta por la unión directa tanto a GRE como a interacciones con factores de transcripción unidos a sitios vecinos BTM (Maquinaria basal de la transcripción). Adaptado de Robert H. Oakley, et. al. ^[168].

En el caso de la transrepresión con NF- κ B se han propuesto varios modelos para describir el mecanismo exacto por el que actúan los CGs, como:

a. MODELO DE DIAFONÍA: Se propone que GR interactúa físicamente con RelA e inhibe su actividad transcripcional. Numerosos grupos de investigación demostraron la represión de GR mediante la asociación física directa con NF- κ B en ensayos *in vitro* ^[169, 170]. Se ha demostrado la interacción entre p65 endógeno y GR en células co-estimuladas con IL-1 α y DEX ^[171]. Experimentos de intercambio de dominio entre el DBD de GR demostraron su importancia en la transactivación y transrepresión ^[172, 173], mientras que el dominio de unión al ligando (LBD) tendría un rol exclusivamente estérico ^[174]. Se encontró que la represión de NF- κ B mediada por GR es altamente dependiente del núcleo del promotor y/o del entorno de la TATA-box ^[175]. Por otro lado, GR es capaz de bloquear la formación del complejo p65/IRF3 ^[176], tal vez mediante el reclutamiento de TIF2 (miembro de la flia. de p160) ^[177, 178] o inhibiendo la fosforilación de IRF3 ^[179].

b. MODELO DE COMPETENCIA POR COACTIVADORES: Como ya mencionamos los coactivadores tienen actividad HAT intrínseca y se ha demostrado que el dominio LBL de los NRs interactúa de manera dependiente de ligando con coactivadores como CBP, P300, y la flia. p160^[180]. Debido a que los mismos coactivadores también están implicados en la maquinaria de transcripción basal de los factores de transcripción p65, AP-1, o GR^[181], se propuso la transrepresión como el resultado de la competencia entre los diferentes factores por una cantidad limitada de cofactores; aunque actualmente las observaciones son más consistentes con la idea de una subdivisión territorial en lugar de una competición por factores^[182]. La competencia entre p65 o AP-1 y GR por cantidades limitantes de CBP, RAC3 o SRC-1 fue propuesta para explicar la transrepresión de genes dependientes de NF- κ B y AP-1, respectivamente^[182-185]. Por otro lado las modificaciones post-traduccionales o chaperonas accesorias pueden regular selectivamente el acceso de cofactores específicos para factores de transcripción^[186].

c. REGULACIÓN DE I κ B α : Otro de los modelos propuestos es el aumento en la síntesis de I κ B^[187]. Aunque esta respuesta parece ser específica de algunos tipos celulares y no un mecanismo universal^[188]. DEX es capaz de estimular la síntesis de I κ B activando directamente la transcripción^[157, 189]. La regulación de I κ B- α es predominantemente observada en linfocitos y monocitos, mientras que este mecanismo no pudo ser observado en células endoteliales o fibroblastos *in vitro*.

Por lo tanto diferentes tipos celulares pueden utilizar vías alternativas para mediar los efectos de los CG (Figura 13). Estos hallazgos demuestran que la regulación de I κ B- α y la represión de los GCs en muchos casos son dos procesos independientes.

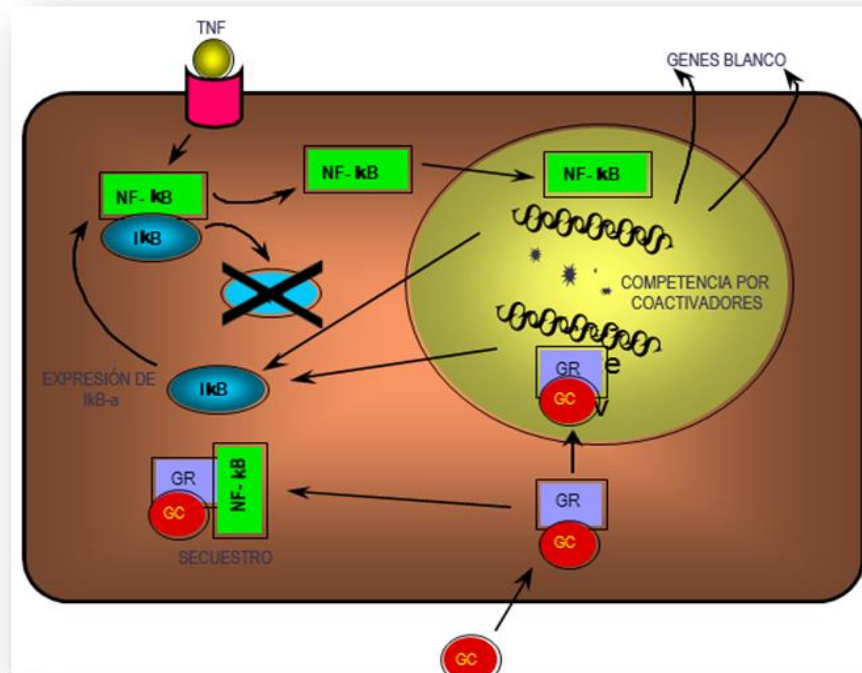


Figura 13. Distintos modelos descritos para la transrepresión GR/NF- κ B.

VI. TUMORIGÉNESIS Y DESARROLLO TUMORAL

El cáncer es una enfermedad muy compleja y los tipos de mutaciones que se producen son muy heterogéneos, pero en la gran mayoría de los tumores (~90%) están relacionados con mutaciones somáticas y factores ambientales ^[190]. Todos coinciden en que para que se origine la tumorigénesis y el subsecuente desarrollo tumoral debe existir cierta inestabilidad genómica que les facilita a las células a modo de círculo vicioso la adquisición de capacidades que le otorguen ventajas y que son producto de las mutaciones. Si bien los sistemas de mantenimiento de la integridad genómica detectan y resuelven defectos en el ADN asegurando que las tasas de mutación espontánea sean muy bajas en cada división celular, las células tumorales logran aumentar su tasa de mutaciones

aumentando la sensibilidad a agentes mutagénicos o bien por fallas en uno o varios componentes de esta maquinaria ^[130, 191, 192].

De esta manera la acumulación de genotipos favorables que le confieren ventajas selectiva a los subclones celulares permiten su extensión y eventual posición dominante en el entorno del tejido local. Se pueden mencionar ciertos fenotipos hereditarios como la inactivación de genes supresores de tumor como la del guardián del genoma p53 ^[193], o bien mecanismos epigenéticos como metilación del ADN y modificaciones en las histonas. Pero, por otro lado el aumento en la tasa de mutación por exposición a agentes mutagénicos exógenos como tabaco, tóxicos o diversas formas de radiación, como luz UV son los que están asociados con mayor incidencia de cáncer de pulmón, hígado y piel, respectivamente ^[194]. Otra fuente importante de inestabilidad genómica es la pérdida de ADN telomérico que en muchos tumores genera inestabilidad cariotípica, amplificación asociada y la supresión de segmentos cromosómicos ^[129]. De esta manera la telomerasa es más que un facilitador para el potencial replicativo ilimitado.

En la actualidad, se han secuenciado 25660 genes y 981720 tumores, lo que resulta en un catálogo de 1627878 mutaciones únicas <http://www.sanger.ac.uk/>. Además dentro de un mismo tipo tumoral, existe una considerable heterogeneidad celular intertumor. Sin embargo, esta complejidad se reduce significativamente si se tienen presentes las vías transduccionales desreguladas, en lugar de el gen alterado en sí mismo ^[195], hecho que tiene implicaciones prácticas para desarrollar terapias dirigidas.

Entre las primeras características que le permiten a las células el crecimiento descontrolado y la inmortalidad replicativa se encuentran el sostenimiento de la señales proliferativas, fallas en los supresores tumorales, la reprogramación de su metabolismo energético y la resistencia a la muerte.

Además, para alcanzar tamaños macroscópicos las células tumorales deben promover la formación de nuevos vasos o angiogénesis y en el caso de aquellos tumores que progresarán a un mayor grado de malignidad activar los

mecanismos de invasión y metástasis para los que se debe desarrollar la transición epitelio mesenquimática (TEM) y finalmente la colonización.

A su vez, los cambios que se producen en el desarrollo tumoral son sin duda permitidos pero también en algunos casos promovidos y mantenidos por el microambiente tumoral y por la respuesta inflamatoria (Figura 14).

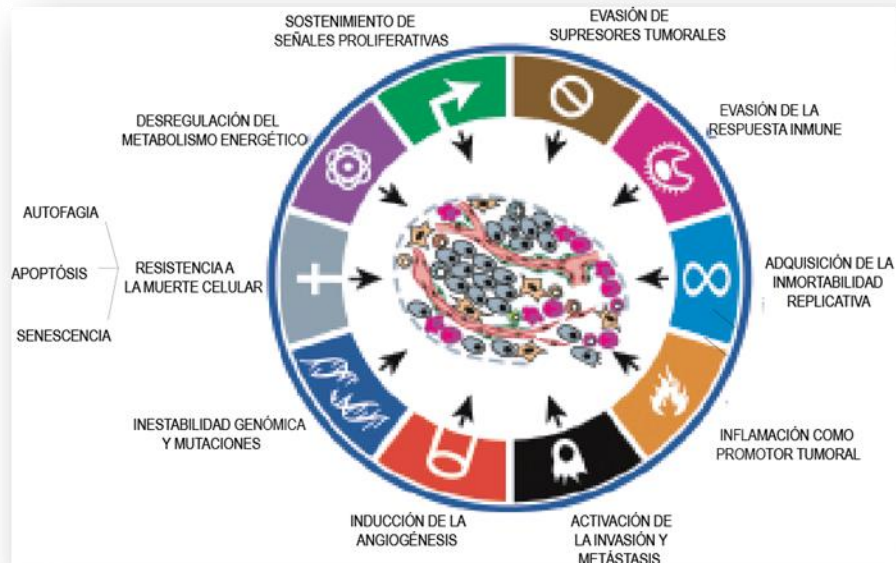


Figura 14. Principales ventajas que logran adquirir o eludir las células tumorales para su desarrollo y avance a la malignidad. Adaptado de Douglas Hanahan & Robert A. Weinberg.^[196]

VI. i. SISTEMA INMUNE VS CÁNCER

Un sistema inmune siempre alerta, es el responsable de reconocer y eliminar la gran mayoría de las células tumorales incipientes. Pero la epidemiología clínica admite cada vez más la existencia de respuestas inmunes antitumorales en algunas formas de cáncer humano^[197]. De acuerdo con esto, cada lesión neoplásica contiene densidades de células del sistema inmune que van desde sutiles infiltraciones sólo detectables con anticuerpos específicos a inflamaciones que se observan por técnicas de tinción histoquímicas estándar^[198].

Sin embargo el rol exacto que cumple el sistema inmune en la resistencia o erradicación de la formación y progresión de neoplasias, tumores en etapa tardía y micrometástasis sigue siendo investigado. En este sentido, se ha documentado el aumento de ciertos tipos de tumor en individuos inmunocomprometidos ^[199], aunque mayormente aquellos inducidos por virus (siendo más del 80% de los tumores de etiología no viral). Además, ratones transgénicos deficientes en varios componentes del sistema inmune inducidos con carcinógenos, desarrollaron tumores con más frecuencia y/o crecieron más rápidamente en relación a los inmunocompetentes. Particularmente, deficiencias en el desarrollo o la función de células T citotóxicas CD8+ (CTL), T *helper* CD4+ Th1, o *natural killers* (NK).

Se han descripto varios mecanismos desarrollados por los tumores para paralizar la infiltración de CTL y NK, como la secreción de factores inmunosupresores de TGF- β ^[200, 201] o el reclutamiento de células T *helper* (Th) y células supresoras de origen mieloide ^[202, 203]. También se ha demostrado que trasplantes de células tumorales de ratones inmunodeficientes tienen baja probabilidad de iniciar tumores secundarios en anfitriones inmunocompetentes singénicos, mientras que las células tumorales iniciadas en ratones inmunocompetentes son igualmente eficientes en la iniciación de tumores trasplantados en ambos tipos de anfitriones ^[204]. También, se ha observado que algunos individuos receptores de trasplantes de órganos inmunosuprimidos desarrollan tumores derivados del donador, sugiriendo que donantes ostensiblemente libres de tumores poseían células tumorales bajo el control, en estado latente de un sistema inmune completamente funcional ^[205]. Por otro lado, individuos HIV positivos inmunodeprimidos farmacológicamente inmunodeficientes en células T y B, aún tienen la capacidad residual para la defensa inmunológica contra el cáncer que se monta por las células NK y otras células inmunitarias innatas.

VI. ii. LA INFLAMACIÓN COMO PROMOTORA TUMORAL

Existen abundantes y convincentes evidencias del efecto como promotor tumoral que las células inmunes y mayormente de la respuesta innata cumplen en la progresión neoplásica ^[194, 206, 207]. Ya sea mediante el suministro de moléculas bioactivas para el microambiente tumoral, como factores de crecimiento, de supervivencia, pro-angiogénicos o enzimas modificadores de la matriz extracelular que facilitan la angiogénesis, invasión y metástasis, o bien señales inductivas que conducen a la activación del programa de TEM, entre otros ^[194, 208, 209].

En este sentido las células del estroma tumoral, incluyendo macrófagos, células dendríticas y fibroblastos producen citoquinas que atraen y reclutan más células inflamatorias elevando aún más la proliferación y la supervivencia. Los macrófagos asociados a tumor (MAT) pueden fomentar la invasión local al suministrar enzimas que degradan la matriz como metaloproteasas y proteasas de cisteína catepsinas ^[210]. Los MAT se pueden activar por la misma IL-4 producida por las células tumorales ^[211]. También se ha descrito un modelo experimental de tumores mamarios metastásicos, donde los MAT suministran el factor de crecimiento epidérmico EGF, mientras que recíprocamente las células tumorales estimulan a los macrófagos con CSF-1 ^[208, 212].

TNF es una de las citoquinas de producción constitutiva en el microambiente tumoral característica de muchos tumores malignos cuya presencia además se asocia con un mal pronóstico. TNF facilita directamente el desarrollo tumoral mediante la regulación de la proliferación y supervivencia de las células neoplásicas o bien ejerce sus efectos indirectamente a través de células endoteliales y otras células inflamatorias del microambiente tumoral. Ratones deficientes en TNF o sus receptores han reducido la susceptibilidad a desarrollar tumores de piel inducidos químicamente y desarrollan menos metástasis experimentales. TNF también puede actuar como un mutágeno promoviendo la proliferación y supervivencia de muchas líneas de células tumorales sin inducir la diferenciación celular o promover la supervivencia tumoral a través de la inducción de moléculas anti-apoptóticas ^[213] y otros factores de crecimiento EGFR y TGF- α .

Por otro lado, TNF colabora con la angiogénesis a través de varios factores angiogénicos como IL-8 y VEGF, y es un regulador crítico de VEGF a través de la vía de JNK y dependiente de AP-1 ^[214]. El pretratamiento de animales con TNF aumenta las metástasis pulmonares en un fibrosarcoma experimental, mientras que la neutralización del TNF endógeno con un anticuerpo anti-TNF reduce la metástasis de pulmón. Además, en algunas células tumorales TNF tiene un rol en la migración y metástasis dependiente de NF- κ B a través de la inducción del receptor de quimiocinas CXCR4, la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), IL-8 y la molécula de adhesión intercelular-1 ^[215, 216].

Referente al rol de NF- κ B en tumores, un aumento de su actividad es evidente en varios tipos tumorales como carcinoma de células no pequeñas de pulmón ^[217], cáncer de tiroides ^[218], leucemias de linfocitos T y B ^[219], melanoma ^[220], cáncer de colon ^[221], de vejiga ^[222], de pulmón ^[223, 224] y de mama ^[225]. Alteraciones cromosómicas en los genes de los miembros de la familia de NF- κ B brindaron evidencias adicionales sobre el rol de este factor de transcripción en la oncogénesis. La activación constitutiva de NF- κ B produce un incremento en la expresión no solo de genes involucrados con procesos inflamatorios sino también anti-apoptóticos y aquellos relacionados con el ciclo celular, adhesión celular, y angiogénesis ^[194] (Figura 8). Algunos de los mecanismos descritos para su activación constitutiva son la secreción autocrina de mediadores inflamatorios, mutaciones o sobre-expresión de ligandos o receptores, expresión aberrante o sobre-expresión de kinasas claves como IKK, entre otros ^[226]. En este sentido, encontramos que NF- κ B activado por TNF induce la proliferación de células T47D vía un aumento de la expresión de Ciclina D1. Asimismo, NF- κ B es requerido aún ante la señal proliferativa de los estrógenos, dado que cuando bloqueamos su activación observamos una inhibición de la respuesta a TNF y a 17- β -estradiol ^[227].

VII. RAC3 UN ONCOGÉN *BONA FIDE*

Si bien desde su mismo descubrimiento se relacionó la sobre-expresión de RAC3 con tumores de ovario y mama ^[5], todavía restaba comprender qué contribución hacía en el desarrollo tumoral o si simplemente era una consecuencia del mismo.

Como desarrollaremos, actualmente RAC3 es considerado un oncogén y las razones de su bautismo son muchas y curiosamente, algunas de ellas no están relacionadas a su función como coactivador de NRs, más aún ciertos roles en tumores se llevan a cabo en el citoplasma celular, como hemos descripto por primera vez ^[228].

VII. i **MODELO DE RATONES TRANSGÉNICOS DE RAC3**

El papel oncogénico de RAC3 se determinó mediante la generación y caracterización de ratones transgénicos MMTV–RAC3. Este estudio demostró que la sola sobre-expresión de RAC3 causa la hipertrofia mamaria, hiperplasia anormal, involución post-destete y desarrollo espontáneo de tumores mamarios malignos. El porcentaje de incidencia de tumores no solo se incrementó en mama (48%) sino también en otros órganos como, útero (18%), glándula pituitaria (42%) y pulmón (18%) ^[229]. Por otro lado, el 16,7% de los tumores mamarios desarrollados fueron ER negativos. Además, congruente con lo hallado al disminuir los niveles de RAC3 y la consecuente disminución de la vía de señalización de IGF–1, los ratones a los que se indujo la sobre-expresión de RAC3 poseen la ruta de señalización de IGF-1 hiperactiva.

Trabajos posteriores realizados por el mismo grupo y el mismo modelo de ratón transgénico pero ovariectomizado (ovx) o bien mutante negativo de ER α , demuestran que la sobre-expresión ectópica de RAC3 todavía induce tumorigénesis en pulmón, pituitaria, piel y tejido óseo. Asimismo en el grupo de ratones ovx que tiene atenuada la vía de señalización del ER e inhibido el

desarrollo de su glándula mamaria, algunos ratones aun desarrollan hiperplasia mamaria y carcinoma ductal ^[230]. RAC3 se halló sobre-expresado en tumores de mama, que no poseen ER o PR ^[231].

Los datos aportados por esta variedad de modelos *in vivo* indican fuertemente que la sobre-expresión de RAC3 dispara la tumorigénesis además por otros mecanismos no dependientes de receptores nucleares o incluso totalmente independientes de ellos.

Paralelamente la depleción de RAC3 suprime significativamente la tumorigénesis mamaria inducida por v-H-ras o el carcinógeno químico 7,12-dimetilbenzo-antraceno (DMBA) ^[232].

VII. ii RAC3 SE ENCUENTRA EN ALTOS NIVELES EN UNA AMPLIA GAMA DE TIPOS TUMORALES

“HORMONO-DEPENDIENTES, U HORMONO-RESPONDEDORES”

- ❖ *Cáncer de mama:* RAC3 se encuentra sobre-expresado o, en algunos casos, su gen amplificado en tumores de mama ^[5, 14, 57, 231, 233-241]. Su sobre-expresión correlaciona con patologías como gran tamaño, alto grado tumoral; mal pronóstico de supervivencia global y reincidencia de la enfermedad ^[57, 231, 236, 237, 239, 240]. En pacientes tratados con tamoxifeno los altos niveles de RAC3 se relacionan con resistencia a la droga y mal pronóstico de supervivencia libre de enfermedad.

Otro caso importante es el de los pacientes con altos niveles de RAC3 y de ERBB2 que exhiben resistencia severa y temprana a la terapia con moduladores selectivos de receptores de estrógeno (SERM) ^[241]. Además, la fosforilación de RAC3 está aumentada en tumores de mama inducidos ERBB2, de manera que los niveles de fosforilación de RAC3 podrían ser un marcador para evaluar la eficacia de inhibidores de la tirosin kinasa. Se postula que la sobre-expresión del receptor ERBB2 activa la vía de las

MAPK kinasas causando la fosforilación de RAC3 y ER por AKT. La kinasa AKT también puede inhibir a GSK3^[61] (Figura 5), lo que sugiere una retroalimentación positiva entre los niveles de RAC3 y la actividad de AKT. Existen numerosos estudios del rol de RAC3 en cáncer de mama en modelos de ratones *in vivo*:

- 1) En modelos de ratones MMTV-*v-ras* (RAS), la incidencia de tumores de mama se redujo drásticamente en ratones vírgenes RAC3^{-/-}; *ras* e inhibió completamente en ratones ovx RAC3^{-/-}; *ras*^[58]. La deficiencia de RAC3 no alteró la expresión de genes dependientes de estrógeno y progesterona en la glándula mamaria y tumores, pero causó resistencia parcial al factor de crecimiento insulina-*like* I (IGF-1) disminuyendo significativamente la expresión del receptor IRS-1 y el IRS-2. La disminución de ésta vía puede ser una de las causas de la represión de la tumorigénesis mamaria y la metástasis en estos ratones.
- 2) En otro modelo se caracterizó el rol de RAC3 en la susceptibilidad de la glándula mamaria a carcinógenos químicos^[232]. Estos estudios sugieren que el rol de RAC3 en el crecimiento ductal de mama es independiente de las células epiteliales mamarias. En ratones tratados con el carcinógeno químico DMBA, la deficiencia de RAC3 protegió a la glándula mamaria de la tumorigénesis pero no a la piel, y en este caso nuevamente la falta de RAC3 disminuyó la disponibilidad de los receptores IRS-1 e IRS-2 y por lo tanto inhibió la activación de AKT, disminuyó la expresión de Ciclina D1 y la proliferación celular.
- 3) En un tercer modelo, se estudió el rol de RAC3 en la tumorigénesis mamaria inducida por MMTV-ERBB2 en ratones RAC3^{-/-}^[242]. Este estudio mostró que el desarrollo de tumores mamarios inducidos ERBB2 se retrasó considerablemente en ratones RAC3^{+/-} y fue completamente suprimido en ratones RAC3^{-/-}. En comparación con el control; los tumores ERBB2, RAC3^{+/-} mostraron la disminución en ERBB2 fosforilada, Ciclina D1 y Ciclina E. También se observó la reducción de la actividad de AKT y JNK, y disminución en la

proliferación celular. Estos hallazgos sugieren fuertemente que RAC3 es requerido para la actividad oncogénica ERBB2.

- 4) En un cuarto modelo se evaluó el papel de RAC3 en la metástasis de tumores de mama mediante el uso de ratones MMTV-PyMT ^[243]. La ablación genética de RAC3 en estos ratones MMTV-PyMT redujo significativamente la metástasis de pulmón.

- ❖ *Cáncer de próstata*: La sobre-expresión proteica de RAC3 en cáncer de próstata se relacionó con un alto grado y estado tumoral, corta supervivencia y recurrencia de PSA (antígeno prostático específico), activación de AKT y proliferación tumoral ^[26, 244-246].

En células de cáncer de próstata, RAC3 activa la vía AKT/mTOR y estimula el crecimiento celular aumentando el tamaño celular. La disminución de los niveles de RAC3 restringe la proliferación de células tumorales y el crecimiento del tumor xenotrasplantado en ratones *nude* e incrementa la apoptosis ^[246, 247].

El rol de RAC3 en cáncer espontáneo de próstata se investigó utilizando el modelo de ratones TRAMP ^[248] *versus* TRAMP/RAC3^{-/-} ^[249]. Los resultados indicaron que la inducción *de novo* de la expresión de RAC3 en células epiteliales parcialmente transformadas es fundamental para progresión de la tumorigénesis de próstata a un carcinoma de células poco diferenciadas.

- ❖ *Cáncer de ovario*: RAC3 se encuentra sobre-expresada y en algunos casos su gen amplificado y correlaciona con la corta supervivencia libre de enfermedad y alto grado tumoral ^[246, 250].
- ❖ *Cáncer de endometrio*: los niveles de ARNm de RAC3 se hallaron sobre-expresados con una frecuencia de 17% y sorprendentemente su proteína se encontró sobre-expresada en un 93% de los casos, y esto correlacionó con un alto grado y estadio tumoral y corta supervivencia ^[233, 251, 252].

cáncer hormono-dependientes	Cambios	Frecuencia	Asociación patológica y pronóstico
	Cáncer de mama		
	Amplificación génica	1.6-9.5%	Gran tamaño tumoral
	Sobre-expresión de ARNm	13-64%	Alto grado tumoral, corta SLE and SG
	Sobre-expresión proteica	16-53%	Alto grado tumoral, corta SLE , corta SG , larga SLE
	Cáncer de próstata		
	Sobre-expresión proteica	13.1-37.9%	Alto grado tumoral, estadio corto de SEE , PSA recurrencia
	Cáncer de ovario		
	Amplificación génica	7.4-25.8%	Corta SLE
	Sobre-expresión proteica	64% de los tumores de alto grado	Alto grado tumoral
	Cáncer de endometrio		
	Sobre-expresión de ARNm	17%	Alto grado y estadio tumoral, corta supervivencia (24 meses)
	Expresión proteica	93%	Alto grado tumoral
	Cáncer de células escamosas de esófago (ESCC)		
	Amplificación génica	4.9-13%	ND
	Sobre-expresión proteica	46-64.3%	Alto grado tumoral. Corta SLP y SEE

Tabla 1. Niveles de expresión y/o amplificación en tumores hormono-dependientes. SLE, supervivencia libre de enfermedad; SG, supervivencia global; SEE, supervivencia específica de la enfermedad; SLP, supervivencia libre de progresión ; PSA, antígeno prostático específico; ND, no determinado. Adaptado de Gang Ma, et. al, 2011 ^[253].

“HORMONO-INDEPENDIENTES”

En la actualidad RAC3 se encontró sobre-expresado en muchos tipos de tumores no dependientes de hormonas esteroideas, de hecho nuestro grupo ha planteado esta hipótesis desde el descubrimiento de su interacción con NF- κ B en el año 2000 ^[46]. Estos hallazgos inducían a sospechar que RAC3 podría contribuir en el desarrollo tumoral independientemente de hormonas esteroideas o NRs. Además, como hemos mencionado en algunos tumores mamarios la tumorigénesis no involucra necesariamente a receptores esteroideos, e incluso se reportaron casos de tumores de mama con alto RAC3 y ER negativos. Más aún,

hemos demostrado que en tumores de mama respondedores a estrógenos y con elevada expresión de RAC3, la vía más importante por la cual esta molécula contribuye a tumorigénesis no es justamente coactivando a ER, sino que los estrógenos requieren de su asociación a NF- κ B en complejos conteniendo RAC3 [227].

Como muestra la tabla 2, RAC3 se halló sobre-expresado o amplificado en muchos tipos tumorales hormono-independientes como páncreas [254, 255], esófago (ESCC) [256], pulmón (NSCLC) [257], gástrico [258], carcinoma colorectal [259], hepatocelular (HCC) [14], de vejiga [258], nasofaríngeos [260] y meningiomas [56].

Resulta interesante en el caso de tumores de páncreas la asociación de los niveles de expresión de RAC3 con la progresión tumoral (pancreatitis < bajo grado de neoplasia intraepitelial pancreática < alto grado de neoplasia intraepitelial < adenoma ductal invasivo) [254]. De hecho, los niveles de RAC3 están asociados a la metástasis y la recurrencia del tumor en el cáncer gástrico [258] y hepatocelular [261]. Tomando estos datos clínicos se puede afirmar que RAC3 tiene un rol importante en la tumorigénesis y el desarrollo tumoral en algunos casos independientemente de sus funciones como coactivador de receptores nucleares.

CÁNCER HORMONO INDEPENDIENTES	Cambios	Frecuencia	Asociación patológica y pronóstico
	Cáncer colorectal		
	Amplificación génica	10-32%	ND
	Sobre-expresión proteica	35-56.5%	Alto grado tumoral. Larga SG
	Cáncer hepatocelular (HCC)		
	Amplificación génica	41% de metastásicos HCC; 60% de recurrentes HCC	ND
	Sobre-expresión proteica	67.6%	ND
	Cáncer pancreático		
	Amplificación génica	37%	ND
	Sobre-expresión de ARNm	73.68%	ND
	Sobre-expresión proteica	64.47%	ND
	Cáncer gástrico		
	Amplificación génica	41% (7% alto nivel de amplificación; 34% bajo nivel de amplificación)	Alta metástasis linfática regional, alto grado y estado tumoral, mal pronóstico
	Sobre-expresión de ARNm	40%	ND
	Cáncer de vejiga		
	Amplificación génica	7.0%	ND
	Sobre-expresión proteica	32.5%	Corta supervivencia
	Cáncer nasofaríngeo		
	Amplificación génica	7%	ND
	Sobre-expresión proteica	51%	Alta metástasis linfática y estado tumoral
	Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)		
	Amplificación génica	8.2-25%	ND
	Sobre-expresión proteica	27-48.3%	Corta supervivencia, corta SLE y SG
	Meningioma		
	Expresión proteica	76%	ND

Tabla 2. Niveles de expresión y/o amplificación en tumores hormono-independientes SLE, supervivencia libre de enfermedad; SG, supervivencia global; ND, no determinado; HCC, cáncer hepatocelular; ESCC, cáncer de células escamosas de esófago; NSCLC, cáncer de pulmón de células no pequeñas. Adaptado de Gang Ma, et. al, 2011 ^[253].

VII. iii REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RAC3

Tal como hemos desarrollado en esta Introducción los niveles de expresión de RAC3 tienen muchas consecuencias en el desarrollo tumoral. En este sentido, en el año 2002 se demostró que el estímulo con 17- β -estradiol en la línea celular de tumor de mama MCF-7 reprime la expresión de RAC3 a nivel transcripcional. Además, este efecto es revertido ante el agregado de anti-estrógenos o ácido transretinoico. Por otro lado, mediante la utilización de TGF- β y anticuerpos específicos anti-TGF- β se demostró que este factor regula la expresión de RAC3 y que es necesario al menos en parte para la modulación positiva por los anti-estrógenos ^[262]. También se ha demostrado que ligandos moduladores selectivos de ER como 4-hidroxitamoxifeno (4HT) y raloxifeno aumentan los niveles proteicos de RAC3 y en la línea celular de cáncer cervical HeLa este efecto es dependiente de ER ^[263]. Un trabajo interesante mediante un análisis de *GeneChip* muestra que p/CIP (RAC3) está aumentado en células B estimuladas con IL-4 por un mecanismo dependiente del factor de transcripción y traducción STAT6 ^[264]. Además el mismo grupo demuestra que RAC3 es un modulador positivo del mismo STAT6 ^[265]. A su vez se ha establecido la existencia de un bucle de retroalimentación positiva sobre la regulación de la expresión RAC3 y el factor de transcripción E2F clave en la regulación de ciclo celular (Figura 15) y del que justamente RAC3 es coactivador ^[39, 42, 266]. El trabajo muestra la regulación positiva de RAC3 por E2F actuando sobre el propio promotor del gen del coactivador aumentando los niveles de RAC3. Los mismos autores, posteriormente demuestran la correlación entre la sobre-expresión de E2F y RAC3 en nódulos linfáticos metastásicos de tumores de mama mediante inmunohistoquímica ^[266].

Por otra parte, también existen evidencias de que la expresión de RAC3 puede ser controlada por microRNAs (miRNAs) endógenos. Los miRNAs son pequeñas moléculas de ARN de simple cadena que bloquean la expresión de los ARN para los que son complementarios. En el caso de RAC3 se vio que el microRNA Mir-17-5p tiene gran complementariedad y puede, por tanto, reducir la

expresión de RAC3. En concordancia con este hallazgo se han encontrado bajos niveles de expresión de Mir-17-5p en líneas de tumor mamario ^[267].

Respecto a la vida media de RAC3 a nivel proteico puede verse modificada por degradación como hemos descripto previamente. Particularmente para RAC3 se han descripto tres ubiquitin ligasas que como se sabe regulan la especificidad de la degradación dependiente del proteosoma, a saber: E6AP ^[268], SCF_{Fbw7α} ^[61] y CHIP ^[269]. Sin embargo, RAC3 también puede degradarse por la vía del proteasoma de manera independiente de ubiquitina y de ATP ^[71].

VII. iv RAC3 Y SOSTENIMIENTO DE LAS SEÑALES PROLIFERATIVAS EN TUMORES

En tejidos normales la producción y liberación de señales de crecimiento que marcan la entrada y la progresión del ciclo celular (Figura 15), son minuciosamente controladas asegurando la homeostasis en el número de células y manteniendo la arquitectura y el funcionamiento normal del tejido. Algunas de estas señales se transmiten en gran parte por factores de crecimiento que se unen a receptores de superficie típicamente con dominios tirosina kinasa intracelular.

Ciertas células tumorales adquieren la capacidad de sostener la señalización proliferativa de múltiples maneras: 1) Produciendo ligandos propios a factores de crecimiento (estimulación autocrina); 2) Enviando señales a las células estromales del soporte tumoral estimulándolas a liberar factores de crecimiento ^[270, 271]; 3) Elevando los niveles de receptor en su superficie, volviéndose hipersensibles a factores de crecimiento. 4) Modificando la estructura de los receptores para activarse independiente del ligando 5) Adquiriendo la independencia de factores de crecimiento por la activación constitutiva de los componentes de las vías de señalización río abajo a los receptores.

Las ventajas que otorga a las células tumorales activar señales río arriba (receptores) *versus* río abajo (transductores) no están claras, como tampoco el

entrecruzamiento entre las múltiples vías que se desprenden de los receptores de factores de crecimiento.

Existen evidencias que muestran que RAC3 es requerido por el factor de crecimiento dependiente de insulina (IGF-1) para la proliferación, supervivencia, señalización y expresión de genes en tumores mamarios ^[272]. Además RAC3 es capaz de regular la transcripción de IGF/AKT, uniéndose a los promotores de IRS-2 o IGF-1 a través de AP-1 ^[52].

Por otro lado nuestro laboratorio demostró que el solo aumento en la expresión RAC3 por transfección de células no tumorales de riñón embrionario humano HEK293 aumenta significativamente la proliferación en ausencia de suero y estas células además adquieren características tumorales, como crecimiento independiente de anclaje formando colonias en *soft agar* ^[156, 273], transición epitelio mesenquimática, migración e invasión (resultados aún no publicados).

VII. v RAC3, CICLO CELULAR Y SUPRESORES TUMORALES

El ciclo celular consta de cuatro fases G1, S, G2 y M. Durante el “Gap” G1, la célula se prepara para la replicación del ADN ^[274], mientras que la propia replicación del ADN se produce en la fase de síntesis (S). Luego el ciclo se interrumpe en un segundo “Gap” (G2), donde se verifica la integridad del ADN replicado y si es necesario se repara. Los cromosomas replicados se separan durante la fase de mitosis (M), del que surgen dos células hijas que a su vez pueden reingresar en el ciclo celular. Las células quiescentes que ya no se dividen entran en la fase G⁰.

La transición entre las diferentes fases del ciclo celular está orquestada por numerosas proteínas, dentro de éstas las kinasas dependientes de Ciclinas (Cdk) son muy importantes. La actividad de las Cdk es regulada por varios mecanismos como su asociación específica con distintas Ciclinas formando el complejo Ciclina-Cdk o su fosforilación en residuos específicos. La inhibición de su unión con las Ciclinas es efectuado por la flia. de INK4 ^[275] (inhibidor de Cdk4) que inhibe

específicamente a Cdk4 y Cdk6 y evita la transición G1/S o la flia. de inhibidores Cip/Kip de Cdk compuesta por p21cip-1, p27kip-1, y p57Kip-2. Tanto p21cip-1 y p27Kip-1 son potentes inhibidores de Ciclina D y Ciclina E ^[276].

Para su desarrollo las células tumorales también deben eludir los programas que regulan negativamente la proliferación celular que en su mayoría dependen de los genes supresores de tumor. En este sentido, el supresor tumoral p53 y el retinoblastoma (Rb) son cruciales en la progresión del ciclo celular. La proteína RB integra señales de diversas fuentes extra e intracelulares ^[162], e impide la transición G1/S inhibiendo la actividad de E2F que regula la expresión de genes requeridos para la fase S. De esta manera la hiperfosforilación de Rb por ejemplo por el complejo Ciclina/Cdk libera a Rb y deja libre a E2F, permitiendo que la célula entre en fase S ^[277]. Por otro lado, p53 recibe señales de sensores de estrés dentro de los sistemas operativos intracelulares (daño genómico, baja disponibilidad de nucleótidos, o reservas como glucosa, o de oxígeno sub-óptimas) y funciona como un regulador negativo de la proliferación del ciclo celular, controlando la apoptosis en las fases G1/S y G2 del ciclo celular. En la fase G1/S, p53 aumenta la transcripción del regulador negativo de Ciclina E/Cdk2 y Ciclina D/Cdk4-6 p21cip-1. La detención en G2 por p53 puede implicar a p21cip-1 y a la proteína 14-3-3 ^[278] tal como muestra la Figura 15.

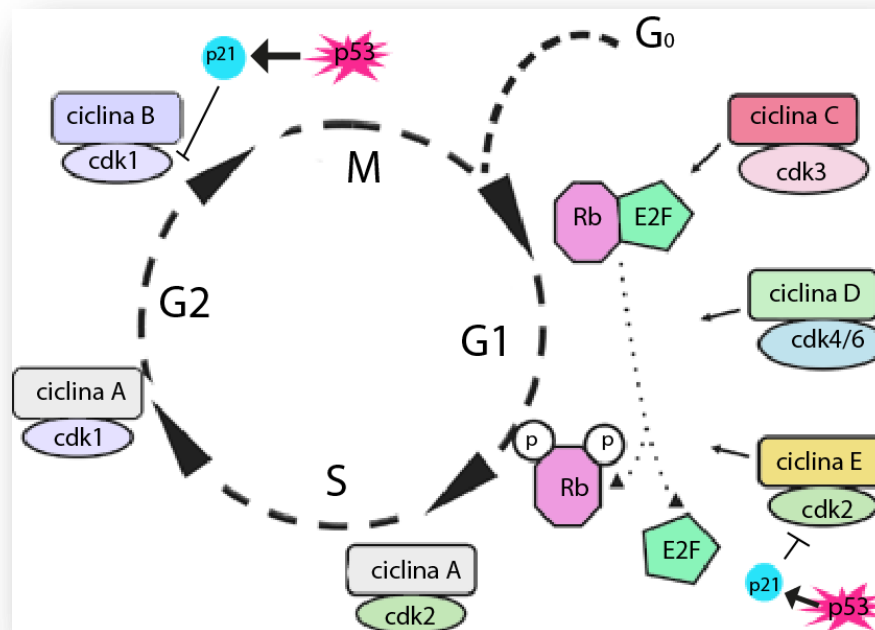


Figura 15. Esquema representativo de las diferentes fases del ciclo celular. Cdk: quinasas dependientes de Ciclina; Rb: retinoblastoma, Fases: S, síntesis, M, mitosis; G₀, G₁, G₂: “Gap” 0, 1 y 2.

Está demostrado que RAC3 puede influenciar el control del ciclo celular a través de la activación de la vía de AKT, inhibiendo la expresión del inhibidor del ciclo celular p21^{Cip1/Waf1} en células de HCC ^[279]. Trabajos realizados con la línea celular de cáncer de mama T47D demuestran que la sobre-expresión de RAC3 mantiene a las células en fase S al tratarlas con el antagonista de estrógenos *fulvestrant* ^[280] y en concordancia con éstos la disminución de RAC3 con RAC3-RNAi disminuyó el número de células en fase S y aumentó el número de células en G₁ en fibroblastos de pulmón embrionario humano y la línea celular HCC ^[279].

Además se ha reportado que la translocación de RAC3 al núcleo coincidió con la transición G₁/S en células tumorales ^[159]. Más aún en un modelo *in vivo* de cáncer de tiroides inducido TR-b en ratón, la depleción de RAC3 aumentó significativamente las células en fase G₁/G₀ y disminuyó las células en la fase G₂/M ^[161].

A su vez como mencionamos anteriormente, RAC3 es coactivador de E2F asociado a la transición G1/S y síntesis del ADN ^[42] y se ha demostrado que la sobre-expresión de RAC3 induce la proliferación y transformación en la línea de tumor de mama epitelial humano MCF10 ER negativa de manera dependiente de E2F ^[280].

Por otra parte, existe evidencia de que la sobre-expresión de RAC3 aumenta los niveles de Ciclina D1 (CD1) aumentando consecuentemente la proliferación celular en presencia de estrógenos en células de tumor ductal mamario ER positivas T47D. Sin embargo, no estaba claro el mecanismo por el cual sucedía debido a que no se encontraban secuencias respondedoras a estrógenos en el promotor de CD1 ^[281]. Nuestro laboratorio ha demostrado que los estrógenos requieren de NF- κ B activo para inducir la expresión de Ciclina D1. De acuerdo con nuestras observaciones, TNF induce la proliferación en la línea celular de tumor de mama T47D vía un aumento de la expresión de CD1, para el que es necesaria la actividad de NF- κ B. Más aún, TNF potencia la acción proliferativa de los estrógenos y éstos requieren de la activación de NF- κ B para inducir proliferación. Postulamos que ER, RAC3 y NF- κ B forman un complejo que se une a secuencias específicas de unión a NF- κ B en el promotor de CD1, y de esta manera lograrían aumentar su expresión ^[227].

Estas evidencias en conjunto muestran que la desregulación de RAC3 puede perturbar la progresión del ciclo celular normal y promover la iniciación del cáncer y la proliferación descontrolada.

VII. vi RESISTENCIA A LA MUERTE CELULAR: RAC3 PROTEGE DE LA APOPTOSIS

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso finamente regulado que involucra cambios morfológicos característicos como encogimiento celular, fragmentación del ADN y formación de cuerpos apoptóticos, que

finalmente son fagocitados sin que se desate una respuesta inflamatoria (Figura 17).

Entre los estímulos que inducen la apoptosis se encuentran elevados niveles de señalización de un determinado oncogén y el daño al ADN asociado a la hiperproliferación.

La maquinaria apoptótica se compone de dos reguladores río arriba que a su vez se dividen en dos circuitos principales: uno de recepción y procesamiento de señales extracelulares o programa extrínseco, que implica al ligando del receptor Fas/Fas, y otro de detección e integración de señales de origen intracelular o programa intrínseco. Los componentes efectores río abajo culminan en la activación de una proteasa normalmente latente (caspasas 8 y 9, respectivamente), que inicia una cascada de señalización que implica la proteólisis de las caspasas efectoras de la fase de ejecución de la apoptosis.

El programa de apoptosis intrínseca es controlado por los miembros pro- y anti-apoptóticos de la familia de proteínas reguladoras Bcl-2. Bcl-2, junto con Bcl-XL, Bcl-w, MCL-1 y A1 son inhibidores de la apoptosis, en gran parte uniéndose y suprimiendo la activación de dos proteínas pro-apoptóticas: Bax y Bak (en la membrana externa mitocondrial). De esta manera si Bax y Bak son liberadas interrumpen la integridad de la membrana mitocondrial externa, liberando proteínas de señalización pro-apoptóticas, como citocromo c y activando una cascada de caspasas responsables de los múltiples cambios celulares asociados con la apoptosis.

Bax y Bak comparten con Bcl-2 dominios de interacción proteína-proteína, que median sus diversas interacciones físicas denominados BH3. Las actividades de esta subfamilia de proteínas relacionadas por contener un único motivo BH3 están acopladas a una variedad de sensores celulares, de este modo las proteínas “BH3-only” interfieren con los miembros anti-apoptóticos como Bcl-2 o directamente estimulan a miembros pro-apoptóticos de esta familia ^[282].

Es sabido que la apoptosis actúa como una barrera natural para el desarrollo tumoral ^[174], sin embargo algunos tumores escapan o disminuyen la apoptosis avanzando a estados de alto grado de malignidad y resisten la terapia

[283]. El más común es la pérdida de función de p53, pero también lo logran aumentando la expresión de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 o mediante la regulación negativa de factores pro-apoptóticos como Bax, Bim y Puma o interrumpiendo la vía extrínseca inducida por ligando.

En relación al rol de RAC3 en la apoptosis nuestro grupo ha demostrado por primera vez, que su sobre-expresión en la línea no tumoral humana de riñón embrionaria HEK293, es capaz de evitar tanto la apoptosis inducida por la vía extrínseca como por la vía intrínseca. El modelo propuesto es el aumento de la actividad transcripcional de NF- κ B y llamativamente por un mecanismo no genómico que involucra la disminución de la actividad de caspasa 9, el aumento en la actividad de AKT y p38, la inhibición de ERK2 y de la translocación del factor apoptótico AIF (Factor inductor de apoptosis 1) al núcleo que queda retenido en el citoplasma [228].

Posteriormente también demostramos que células leucémicas humanas: K562 con altos niveles de RAC3 e insensibles al tratamiento anti-tumoral con *flavopiridol* o TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*), son sensibilizadas al mismo con la sola disminución de sus niveles de expresión mediante RAC3-RNAi, que además provoca la disminución de la actividad NF- κ B y subsiguiente muerte celular [284].

Otros grupos también han demostrado la relación de altos niveles de expresión de RAC3 con la disminución en los niveles de expresión del inhibidor de la apoptosis Bcl-2 en la línea de cáncer de próstata PC3 [246] y el incremento en los niveles de caspasa 7 clivada (activa) en la línea celular metastásica de células no pequeñas de cáncer de pulmón NSCLC H1299 [246, 285]. Posteriormente, también se ha demostrado que la disminución en los niveles de RAC3 en células linfoides Jurkat inhibe la expresión de los genes anti-apoptóticos blanco de NF- κ B [286].

Por otra parte se ha descrito que RAC3 puede proteger de la apoptosis a través de la vía de AKT [287]. En estos experimentos se vio en que el *knockout* de RAC3 reduce la activación de AKT, y por lo tanto atenúa la supresión de JNK, llevando a la apoptosis a linfocitos de pollo DT40 [288]. En éste contexto hemos

demostrado que la protección de la apoptosis al sobre-expresar RAC3 involucra también la activación de la vía de AKT ^[228].

VII. vii RAC3 EN LA ACTIVACIÓN DE LA INVASIÓN Y METÁSTASIS

El Programa de transición epitelio mesenquimática (TEM) es un proceso multifacético de varios pasos que les permite a las células tumorales llevar a cabo la invasión y la metástasis. La TEM puede ser activada de forma transitoria o estable, y en diferentes grados por las células tumorales. Un conjunto de factores de transcripción actúan pleiotropicamente para orquestar la TEM, como Snail, Slug, Twist, y ZEB1/2 ^[289, 290]. Distintivamente las células en TEM pierden la adhesión a otras células y a la propia matriz extracelular disminuyendo por ejemplo la molécula de adhesión célula-célula E-cadherina ^[291] o contrariamente, incrementando moléculas que se asocian con migraciones celulares durante la embriogénesis y la inflamación como N-cadherina. Otro rasgo distintivo es que se convierten de una morfología poligonal/epitelial a alargada/fibroblástica, expresan las enzimas que degradan la matriz, aumentan la motilidad y poseen mayor resistencia a la apoptosis.

Cabe mencionar que existe cierta plasticidad en este programa lo que implica la posibilidad de reversibilidad, de manera que células tumorales que han difundido a partir del tumor primario a un sitio de tejido distante al perder los beneficios del estroma activado y las señales de invasión del tumor primario, pueden pasar por el proceso inverso, denominado transición mesenquimal epitelial (TME) que puede resultar en la formación de nuevas colonias tumorales con histopatología similar a las de las células de carcinoma del tumor primario que nunca se sometió a la TEM ^[292].

En líneas generales la invasión y metástasis consiste en una sucesión de pasos que comienza con la invasión local, seguido de la intravasación de las células tumorales en la sangre y vasos linfáticos cercanos, su tránsito en ellos seguido de la extravasación de tales vasos en el parénquima de los tejidos

distantes, que prosigue con la formación de pequeños nódulos de células tumorales (micrometástasis) y finalmente el crecimiento a tumores macroscópicos o "colonización". Este último paso es muy importante ya que pacientes con innumerables micrometástasis que han difundido exitosamente nunca logran progresar a tumores metastásicos macroscópicos ^[293], de acuerdo con esto se han descrito casos donde el tumor primario puede liberar factores supresores sistémicos que hacen que este tipo de micrometástasis permanezca en estado latente ^[294]. En otros, como en tumor de mama, las metástasis macroscópicas pueden entrar en erupción décadas después de que el tumor primario ha sido extirpado quirúrgicamente o destruido farmacológicamente ^[295]. En este sentido como ya describimos existe un mecanismo muy importante de latencia, la autofagia. Otros mecanismos de latencia pueden implicar acciones anti-tumorales del sistema inmune ^[296, 297].

Como se mencionó anteriormente existen estudios clínicos donde se vio que RAC3 tiene un rol importante en la invasión y la metástasis ^[239, 254, 259, 261, 298]. Un estudio reciente ha correlacionado a RAC3 con niveles elevados de Smad-2 (proteína efectora en la señalización por TGF- α) y marcadores de TEM, β -catenina, Twist y vimentina ^[269]. La sobre-expresión de RAC3 a través de la expresión de Twist podría conferir una ventaja invasiva. Además se demostró que la sobre-expresión de RAC3 aumenta la expresión de las metaloproteasas MMP-7, MMP-10, MMP-2 y MMP-13 en líneas celulares de tumor de mama y próstata ^[299, 300]. Por otro lado, se ha correlacionado la expresión de RAC3, PEA3, MMP-2 y MMP-9 e inversamente líneas celulares RAC3^{-/-} poseen bajos niveles de MMP-2 y MMP-9 ^[243].

VII. viii RAC3 DELTA 4

En el año 2001 se halló e identificó una variante de *splicing* de RAC3 con una delección en el exón 4 sobre-expresada en líneas celulares y tumores de mama. Esta delección provoca un corrimiento en el marco de lectura que crea un

nuevo sitio de inicio de la traducción en el exón 7 y un codón de stop en el exón 5^[301]. En comparación con RAC3 esta variante pierde el dominio N-terminal bHLH-PAS; requerido para interacciones proteína-proteína^[49, 302, 303], la señal de localización nuclear (NLS)^[44, 54] y la Treonina24 (uno de los siete sitios de fosforilación conocidos para regular su actividad)^[64, 65]. Llamativamente, está demostrado que a pesar de haber perdido la señal NLS, aún coactiva NRs incluso más eficientemente que RAC3 en ensayos de transfección transiente^[272, 301]. La sobre-expresión de esta variante está involucrada en metástasis de tumores mamarios con un novedoso rol en la membrana celular participando en la vía de EGF^[304].

VIII. AUTOFAGIA

La autofagia es un proceso celular altamente regulado que permite a las células descomponerse en orgánulos celulares, como ribosomas y mitocondrias, permitiendo que los catabolitos resultantes se reciclen en caso de ser necesario y sean reutilizados para la biosíntesis y el metabolismo energético. De esta manera las vesículas intracelulares o autofagosomas envuelven los orgánulos intracelulares y luego se fusionan con los lisosomas donde se produce la degradación que genera metabolitos de bajo peso molecular que sirven de soporte por ejemplo en la supervivencia en entornos limitados en nutrientes (Figura 17).

Aunque la autofagia ocurre en niveles basales en todas las células, diversos factores como estrés celular, o daño mitocondrial o del retículo endoplasmático^[305] o bien la privación de nutrientes son fuertes inductores de esta maquinaria de degradación. En algunos casos, la autofagia también puede ser inducida por factores de transcripción como HIF-1 α y FoxoA1, implicados en la respuesta a condiciones de hipoxia y el envejecimiento, respectivamente^[305].

La maquinaria autofágica tiene componentes de regulación y efectores^[175, 306]. Los efectores son proteínas que median la formación del autofagosoma (Figura 16) y la entrega a los lisosomas. El mecanismo molecular por el que ocurre es complejo e implica varios pasos^[307], tal que la interferencia en la

iniciación podría conducir a la completa inhibición de la autofagia, y el bloqueo de la maduración podría dar lugar a una acumulación anormal de autofagosomas inmaduros en las células normales ^[175].

La activación de la autofagia en respuesta a la privación de nutrientes requiere la liberación de Beclin (Atg6 (*autophagy-related gene*) 6 en levaduras) de su unión con otra proteína de la flia. BH3-*only* Bcl-2 ^[308]. Beclin libre junto a la proteína vacuolar (VPS) 34, vps15 y Atg14 forman el complejo PI3K ^[309]. La actividad de la PI3K de clase III produce fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) que recluta proteínas Atg adicionales generando el complejo de nucleación que dará lugar a la autofagosoma ^[305].

El alargamiento limitante *de novo* de la membrana donde contribuyen la membrana plasmática ^[310], el retículo endoplasmático ^[311] o la mitocondria ^[312] y la formación del autofagosoma requiere dos cascadas de conjugación independientes que ocurren en paralelo: la Atg5/12 ^[313] y la de LC-3 (*light chain 3*, Atg8 en levaduras) ^[314], los cuales a su vez requieren de una serie de proteínas Atg adicionales ^[315]. En el caso de LC3 requiere la unión directa de p62/SQSTM1 que se degrada en la autofagia y puede servir para enlazar proteínas ubiquitinadas a la maquinaria autofágica. Luego los autofagosomas secuestran el material citoplasmático con destino a la degradación y lo entregan a los lisosomas mediante la fusión asistida por hidrolasas ácidas que sirven para la ruptura de carga. Los productos desglosados, aminoácidos y ácidos grasos son reutilizados después de su flujo de salida en el citosol facilitado por permeasas de membrana lisosomal y transportadores (Figura 16).

La autofagia y NF-κB poseen reguladores comunes, ambos son capaces de controlarse el uno al otro a través de bucles de retroalimentación positiva o negativa, garantizando la respuesta homeostática ^[316].

Paradójicamente, la autofagia contribuye tanto a procesos normales como patológicos. El rol de la autofagia en tumores puede ser controversial ^[306], por ejemplo ratones con el gen de Beclin-1 inactivado aumentan la susceptibilidad al cáncer ^[317], sugiriendo que la autofagia sirve como barrera contra la tumorigénesis

o contrariamente en situaciones de estrés como deficiencia de nutrientes, radioterapia, u otros la inducción de niveles elevados de autofagia serían citoprotectores para las células tumorales ^[317-319]. En este sentido se ha demostrado que células tumorales estresadas se convierten a un estado de latencia reversible a través de la autofagia ^[317, 320] que les podría permitir la persistencia y el eventual rebrote de algunos tumores en estado tardío post-tratamiento con agentes antitumorales. Por lo tanto la autofagia puede tener un doble efecto en tumores, ya sea de inhibición durante las primeras etapas tumorales o de promoción en etapas posteriores o durante la quimioterapia permitiendo el mantenimiento del tumor en estado latente ^[307].

Un regulador negativo clave de la autofagia es la vía mTOR que inhibe la autofagia a través de la fosforilación e inactivación de elementos que forman parte del complejo que inicia la autofagia como la kinasa unc-51-like 1 (ULK1 o Atg1 en levaduras), Atg13 y FIP200 (*focal adhesion kinase family interacting protein*) ^[321, 322], y a su vez regula al supresor de la autofagia DAP1 (proteína asociada a la muerte 1) ^[323]. También se halló que un regulador de formación temprana del autofagosoma en levaduras WIPI2 (ortólogo de Atg18 en mamíferos) es un potencial efector de mTOR ^[324]. A su vez, mTORC1 también regula negativamente la biogénesis lisosomal en parte impidiendo que migre al núcleo el factor de transcripción EB (TFEB) que controla muchos genes claves en la función lisosomal y otros que promueven la formación del autofagosoma ^[325].

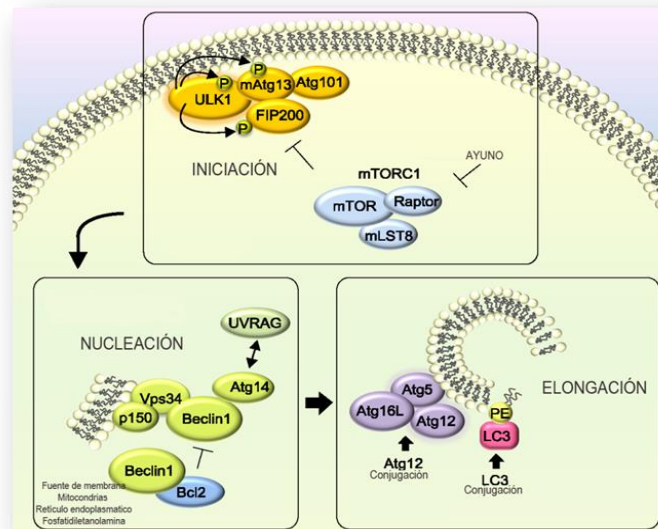


Figura 16. Descripción de las tres principales etapas de formación del autofagosoma y las moléculas intervinientes. Adaptado de Jong-Ok Pyo, et. Al ^[326].

Es importante destacar que se han revelado intersecciones entre los circuitos de regulación que rigen la autofagia, la apoptosis y la homeostasis celular. Por ejemplo, la vía de señalización que implica la PI3K y a las kinasas AKT y mTOR, es estimulada por señales de supervivencia bloqueando la apoptosis e inhibiendo la autofagia, análogamente cuando las señales de supervivencia son insuficientes, la vía de señalización de PI3K disminuye y de esta manera puede inducirse la autofagia o la apoptosis ^[175, 189, 327]. Otra interconexión entre estos dos programas es la proteína Beclin-1 necesaria para inducir la autofagia ^[189] que pertenece a la sub-familia de proteínas BH3-*only*, quien mediante su dominio BH3 puede unirse a las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2/Bcl-XL. De esta manera las proteínas acopladas a sensores de estrés (por ejemplo, Bid, Bad, Puma, etc.) pueden desplazar a Beclin-1 permitiéndole activar la autofagia y liberando las proteínas anti-apoptóticas. Por lo tanto, proteínas BH3 que transducen el estrés puede inducir la apoptosis o la autofagia dependiendo del estado fisiológico de la célula.

Por otra parte, también se ha descrito otro tipo de muerte celular o necrosis donde las células se hinchan y estallan, liberando su contenido en el

microambiente del tejido local como muestra la Figura 17. En este caso, si bien la liberación de señales pro-inflamatorias en el microambiente puede reclutar células inflamatorias para evaluar el grado de daño y eliminar los restos necróticos, también es cierto que la liberación de factores como IL-1 α , puede estimular a las células vecinas viables a proliferar [299]. En consecuencia, las neoplasias incipientes y tumores potencialmente invasivos y metastásicos pueden obtener una ventaja al tolerar cierto grado de muerte celular necrótica. En la actualidad se cree que la necrosis en algunas circunstancias está bajo control genético, en lugar de ser un proceso aleatorio y no dirigido como se creyó históricamente [243, 300].

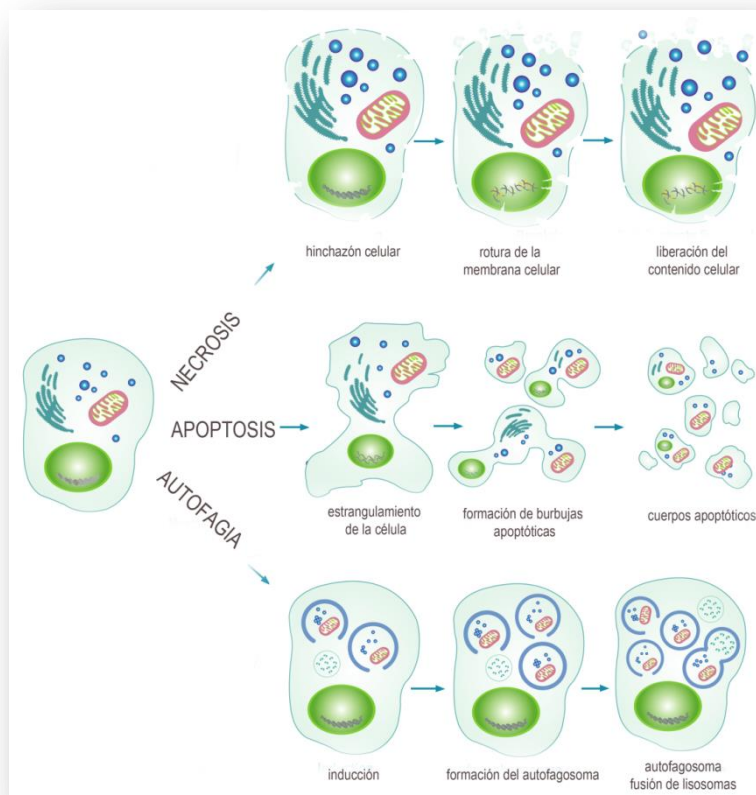


Figura 17. Principales diferencias entre las distintas formas de muerte celular. Adaptado de www.imgenex.com

VIII. I LA VÍA mTOR

La vía mTOR (*mammalian TOR –(target of rapamycin)*) fue conocida en un principio por ser blanco de una molécula anti-fúngica denominada Rapamicina (Rapa) ^[172]. La Rapa es un macrólido lipofílico aislado originalmente de un microorganismo autóctono de la isla “Rapa Nui” la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*.

mTOR es una proteína serina/treonina kinasa atípica de 280KDa evolutivamente conservada perteneciente a la familia de las PIKK (quinasas relacionadas con fosfatidilinositol 3-quinasas). mTOR interactúa con varias proteínas para formar dos grandes complejos: mTORC1 y mTORC2 que tienen diferentes sensibilidades a la Rapa, así como entradas y salidas río arriba y río abajo. Los dos complejos comparten la subunidad catalítica de mTOR, y también a la proteína mLST8 o GBL ^[316], a DEP que contiene el dominio de interacción con mTOR (DEPTOR) ^[328], y al complejo Tti1/Tel2 ^[186]. En contraste, la proteína reguladora asociada blanco de Rapamicina de mamíferos (Raptor) ^[183] y el sustrato de Akt rico en Prolina de 40kDa (PRAS40) ^[184] son específicos de mTORC1, mientras que la proteína insensible a Rapamicina de mTOR (Rictor) ^[182], la proteína 1 que interacciona MAPK activada por estrés (mSin1) ^[141], y la proteína observada con Rictor 1 y 2 (protor1/2) ^[134] son solo parte de mTORC2.

Actualmente se sabe que la Rapa forma un complejo con ganancia de función con la proteína intracelular de 12kDa de unión a FK506 FKBP12 ^[135] que directamente interactúa e inhibe a mTOR cuando es parte del complejo mTORC1 pero no de mTORC2. La Rapa puede comprometer la integridad estructural de mTORC1 ^[135, 136], así como reducir alostéricamente la actividad específica de su dominio kinasa ^[137] (Figura 18).

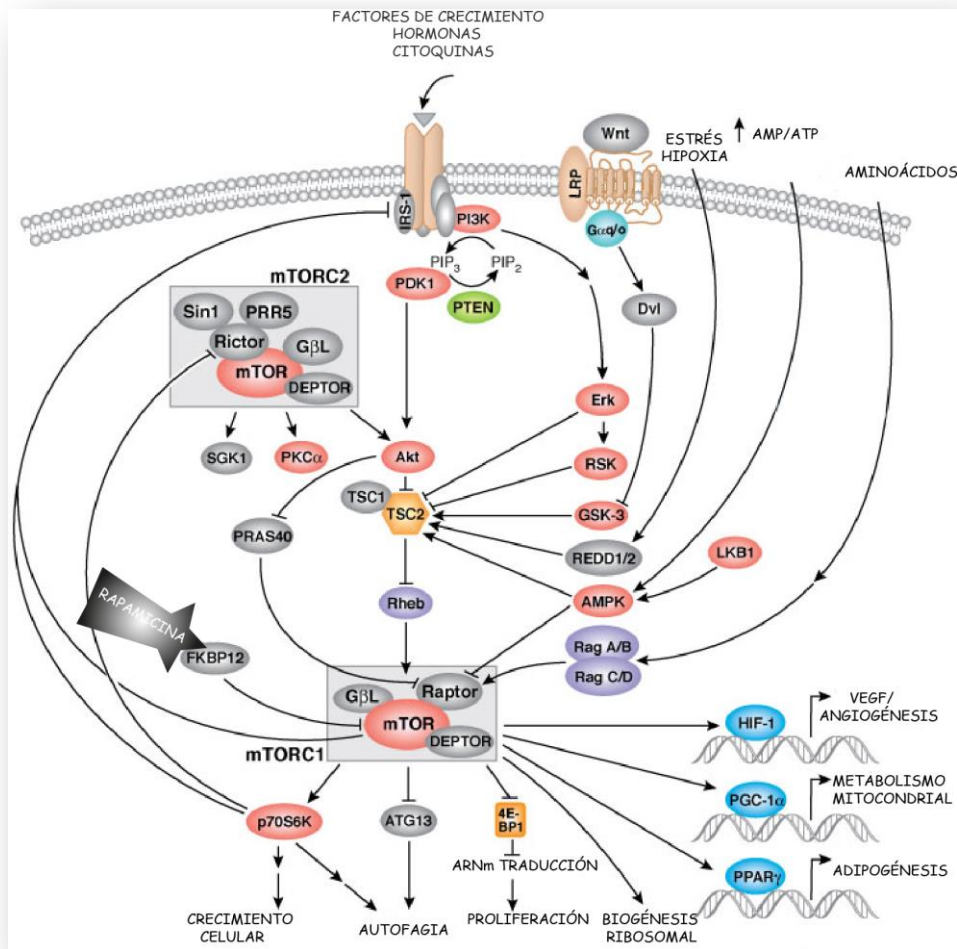


Figura 18. La vía mTOR y la multiplicidad de señales que censa, vías que activa e integra.

Adaptado de <http://flipper.diff.org/app/pathways/595>.

a. mTORC1: La vía mTORC1 censa el estado energético, de oxígeno y de aminoácidos de la célula para controlar muchos procesos substanciales, como la síntesis de proteínas y de lípidos y la autofagia.

Un regulador clave río arriba de mTORC1 es el heterodímero TSC1 (hamartina) y TSC2 (tuberina) que transmite señales como la respuesta a insulina y el factor de crecimiento insulina-like 1 (IGF-1). De esta manera las kinasas efectoras de estas vías como Akt/PKB, ERK1/2, y S6 RSK1 fosforilan

directamente al complejo TSC1/TSC2 inactivándolo y por lo tanto activando a mTORC1 (Figura 18).

mTORC1 controla la síntesis proteica fosforilando directamente reguladores traduccionales como la proteína de unión al factor de iniciación de la traducción eucariótico 4E1 (4E-BP1) requerido para la traducción Cap-dependiente y a la kinasa 1 S6 (S6K1) que aumenta la biogénesis de ARNm, y la iniciación y elongación traduccional. A su vez, también es clave para el control de la traducción de los ARNm 50TOP que codifican para la mayor parte de los componentes de las proteínas de la maquinaria traduccional ^[329] y regula el aumento en la síntesis de proteínas activando el elemento regulador tripartito TIF-1A que promueve su interacción con la ARN polimerasa I y la expresión de ARN ribosomal ^[330]. mTORC1 igualmente puede fosforilar e inhibir al represor de la Polimerasa III: Maf1 e inducir la transcripción de ARNr5S y ARN de transferencia (ARNt) ^[331].

Adicionalmente mTORC1 controla la síntesis de lípidos requerida para generar membranas en la proliferación ^[332] reduciendo la expresión de la proteína reguladora de unión al elemento de esterol medio (SREBP1/2) que controla la expresión de genes implicados en la síntesis de ácidos grasos y colesterol ^[333] y además promueve la expresión y actividad de PPAR- γ , factor clave en la adipogénesis ^[334].

A su vez, mTORC1 puede regular positivamente el metabolismo celular y la producción de ATP activando la transcripción y la traducción del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF-1 α) ^[335] o aumentar el contenido de ADN mitocondrial y la expresión de genes implicados en el metabolismo oxidativo, mediando en parte la asociación nuclear del coactivador PGC-1 α y el factor de transcripción *Ying-Yang* 1 (YY1) que regula positivamente la biogénesis mitocondrial y la función oxidativa ^[336] (Figura 19).

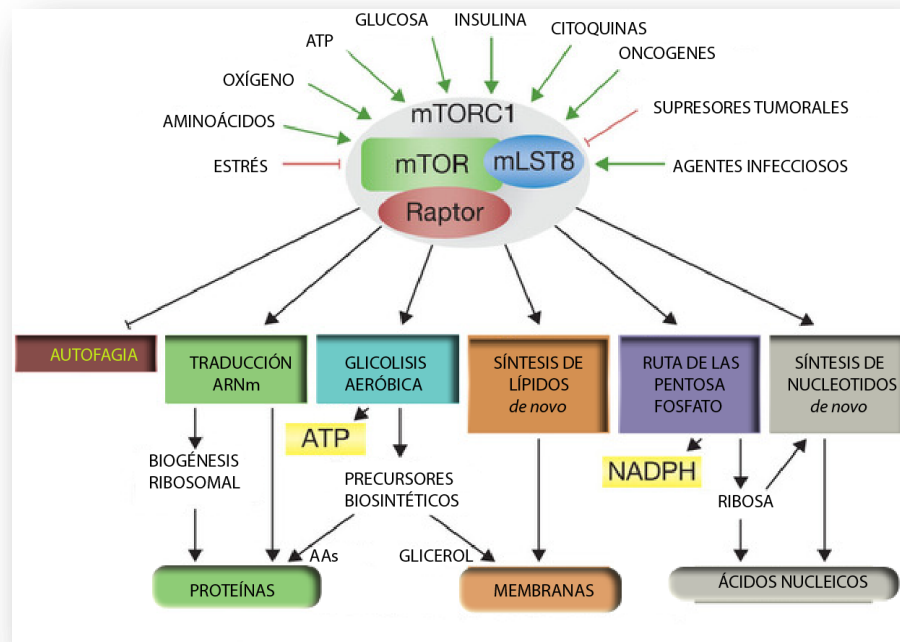


Figura 19. Vía mTORC1. Señales que activan a mTORC1, procesos metabólicos que se pueden desencadenar e inter-relaciones entre las vías en el crecimiento celular y la proliferación. Adaptado de Christian C. Dibble & Brendan D. Manning, 2013 ^[328].

b. SEÑALES QUE ACTIVAN O INHIBEN A mTOR: Akt activa a mTORC1 de manera independiente de TSC1/2 fosforilando y disociando al inhibidor de mTORC1 PRAS40 ^[184]. Las citoquinas pro-inflamatorias como TNF, activan mTORC1 activando a la I κ B kinasa B (IKK β) que fosforila a TSC1, causando la inhibición TSC1/2 ^[337]. Por otro lado, la vía de señalización Wnt canónica que regula la proliferación, polaridad y diferenciación celular, inhibe a la kinasa glucógeno sintasa 3b (GSK3- β), que normalmente fosforila y promueve la actividad TSC2 activando a mTORC1 ^[338]. En el caso de los aminoácidos, particularmente Leucina y Arginina activan a mTORC1 de forma independiente de TSC1/2 y deben estar presentes en cualquier señal río arriba, incluyendo factores de crecimiento, para poder activarla ^[339].

A su vez muchos factores de estrés inhiben a mTOR actuando en parte a través de TSC1/2 por ejemplo en respuesta a condiciones de hipoxia o a un

estado de baja energía donde la MAPK kinasa fosforila a TSC2 e induce la expresión de regulador transcripcional de respuesta al daño del ADN 1 (REDD1), que activa a TSC2 ^[224, 340]. El daño en el ADN también inhibe a mTORC1 a través de mecanismos que requieren la transcripción p53 dependiente ^[341].

c. LA VÍA mTOR EN CÁNCER Y RAC3: Numerosos componentes de la vía de señalización de PI3K, río arriba de mTORC1 y 2 están mutados en tumores humanos, igualmente la pérdida de p53 promueve la activación mTORC1 ^[342]. Además, varios síndromes de cáncer familiar surgen de mutaciones en proteínas río arriba de mTOR, como TSC1/2. La desregulación en la síntesis proteica río abajo de mTORC1 a nivel de 4E-BP1/eIF4E juega un rol central en la formación del tumor. La pérdida de 4E-BP1/2 y la activación concomitante de la traducción Cap-dependiente promueve la progresión en el ciclo celular y la proliferación celular en cultivo ^[343]. eIF4E afecta la traducción de los ARNm específicos que codifican para proteínas pro-oncogénicas que regulan la supervivencia celular, la progresión del ciclo celular, la angiogénesis, el metabolismo energético, y la metástasis.

El aumento en la síntesis de lípidos *de novo* es característico de la proliferación de células tumorales ^[344, 345], además SREBP1 también regula la expresión de los componentes de la ruta de las pentosa fosfato controlando no sólo la lipogénesis sino también la biosíntesis de nucleótidos ^[346].

Respecto a la relación de RAC3, con la vía mTOR y tumores, además del ya descrito para cáncer de próstata, en un modelo de ratones transgénicos de RAC3 que da lugar a un fenotipo mamario hiperplásico pre-maligno y a una alta incidencia de tumores mamarios ER+ se vio que RAC3 provocaba la sobre-activación del receptor de la vía IGF1-*like* sugiriendo la participación de la vía PI3k/AKT/mTOR ^[229]. En el año 2006 los mismos autores demuestran que el tratamiento de estos ratones con el inhibidor farmacológico de la vía mTOR RAD001 revertía el fenotipo pre-maligno y que el tratamiento de líneas celulares derivadas de tumores mamarios RAC3-dependientes con RAD001 las arrestaba en la fase G1 del ciclo celular. También observaron que la inhibición

del crecimiento tumoral post-inyección de ER fue significativamente mejor que la inhibición por tamoxifeno solo, mientras que una combinación de ambos fue todavía más eficaz. Los autores sugieren que RAC3 puede ser un factor predictivo de respuesta RAD001 ^[347].

IX. ANGIOGÉNESIS E HIPOXIA

Durante la progresión tumoral, el *switch* angiogénico permanece prendido, causando que la vasculatura quiescente brote continuamente a nuevos vasos. La neovasculatura tumoral se caracteriza por la brotación capilar excesiva, ramificación, vasos distorsionados y ampliados, el flujo sanguíneo irregular, micro-hemorragias, permeabilidad y niveles anormales de proliferación de células endoteliales y apoptosis ^[79]. A su vez, diversos tipos tumorales exhiben distintos patrones de neovascularización, algunos de ellos, incluyendo los más agresivos como adenocarcinomas ductales pancreáticos, son hipovascularizados y repletos de desiertos estromales que hasta pueden ser activamente anti-angiogénicos ^[80]. En contraste otros tumores, incluyendo el renal humano y carcinomas neuroendocrinos pancreáticos, son altamente angiogénicos ^[81].

Algunos reguladores angiogénicos son proteínas de señalización que se unen a los receptores de membrana en las células endoteliales vasculares. Un importante inductor de la angiogénesis es el factor de crecimiento endotelial vascular-A (VEGF-A) cuya expresión puede ser aumentada por condiciones de hipoxia y por señalización oncogénica ^[73]. En este sentido, el microambiente hipóxico juega un rol crítico en tumores. Los tumores sólidos, presentan comúnmente regiones de hipoxia en todo el tejido debido tanto a la vasculatura caótica, como al flujo de sangre irregular en las regiones necróticas. Los efectos de la hipoxia están mediados principalmente por factores de transcripción HIF compuestos por una subunidad alfa sensible a oxígeno (HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α) y una subunidad beta expresada constitutivamente (HIF- β , conocida como ARNT) ^[348]. HIF regula la expresión de genes implicados en el control del metabolismo

anaeróbico, la angiogénesis, la proliferación celular, la apoptosis y la diferenciación.

La cantidad de HIF- α , es regulada post-traduccionamente, degradándose rápidamente en condiciones de normoxia a través de la vía de ubiquitinación del proteosoma dependiente de von Hippel–Lindau, mientras que en condiciones de hipoxia se inhiben las prolihdroxilasas dependientes de O₂ (PHD) ^[349], que degradan su dominio dependiente de O₂, estabilizando las subunidades α que se trasladan al núcleo y forman dímeros con HIF- β . Se ha demostrado que los niveles de HIF-1 también pueden incrementarse por genes supresores de tumor disfuncionales como p53, TSC2, PTEN (*Protein/lipid phosphatase*) y LKB1, entre otros; así como por proteínas de virus oncogénicos ^[350]. Por otro lado la hipoxia tisular también es común durante la inflamación crónica debido al aumento de la actividad metabólica que interrumpe la perfusión en el sitio inflamado.

Está demostrado que las condiciones de hipoxia en un tumor conllevan a una mayor actividad transcripcional de HIF metastásica más allá de su actividad en el tejido sano ^[351, 352]. Muchos estudios demostraron que la activación de HIF-1/2 por hipoxia en tumores es un mecanismo muy importante que conduce a una mayor agresividad del tumor, la metástasis y mortalidad ^[353]. Entonces la activación de VEGF por el factor de transcripción inducible por hipoxia HIF-1 es un mecanismo clave en la angiogénesis inducida por hipoxia y la metástasis ^[354, 355].

Otra característica distintiva de tumores es la capacidad de modificar su metabolismo energético o efecto Warburg, donde a diferencia de las células normales que adaptan su metabolismo a la presión de O₂ ambiental, las células tumorales siempre prefieren la glucólisis durante el ciclo de Krebs, independientemente de la disponibilidad de oxígeno, consumiendo más glucosa y produciendo menos ATP, aún en aerobiosis lo que puede explicarse por la estabilización mediada por el oncogén de HIF-1 α -hipoxia independiente ^[356, 357].

Resulta importante el hecho de que se ha descripto que las vías de NF- κ B y HIF están íntimamente asociadas, y que existe un importante nivel de interferencia entre ellas tanto *in vitro* como *in vivo* ^[358], de hecho se ha demostrado que la

expresión del ARNm de HIF aumenta a través de mecanismos dependientes de NF- κ B^[359]. Más aún se postula que es fundamental la presencia de la vía canónica de NF- κ B intacta para la regulación de genes mediada por HIF en la inflamación^[360].

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Conceptos destacados de la Introducción y construcción de la hipótesis:

RAC3 es un oncogén, de hecho en su mismo hallazgo se lo halló en altos niveles en tumores de mama y ovario, en donde tal vez se podía pensar que su rol en éstos tendría relación con su capacidad de aumentar la actividad de los receptores nucleares y en consecuencia, la expresión de los genes blanco de hormonas esteroideas involucrados en la proliferación celular. Pero el hecho de que hallamos descubierto que coactivaba además al factor de transcripción no esteroideo NF- κ B, que no solo regula la expresión de genes involucrados en la respuesta inflamatoria sino que también numerosos genes relacionados con el desarrollo tumoral sumado a que luego otros autores demostraron que coactiva a diferentes factores como el mismo E2F, factor clave en la transición G1/S del ciclo celular sugería que probablemente RAC3 podría hallarse aumentado en otros tipos tumorales.

Es así que actualmente se demostró que RAC3 se encuentra mayormente sobre-expresado y en algunos casos su gen amplificado en numerosos tumores no respondedores a hormonas como tumores de vejiga, hígado, nasofaríngeos, y esófago e incluso en algunos de ellos sus niveles correlacionan con el progreso a la malignidad como en el caso de tumores de páncreas. Por su parte la lista de tumores respondedores a hormonas siguió creciendo como tumores de próstata, endometrio y otros. A su vez en el año 2001 se halló e identificó una variante de *splicing* de RAC3 sobre-expresada en líneas celulares y tumores de mama involucrada en la metástasis con un novedoso rol en membrana.

Estas evidencias permiten que actualmente RAC3 pueda ser propuesto no solo como un indicador de malignidad y pronosis como en el caso de tumores de hígado sino de también resistencia a determinadas terapias como tamoxifeno u otras.

Las derivaciones de los altos niveles de RAC3 en tumores son mucho más amplias de las esperadas y sus roles siguen creciendo contribuyendo a la

tumorigénesis de numerosas maneras y algunas de ellas no relacionadas con receptores esteroideos o con su rol nuclear como coactivador.

Se encontró que la expresión de RAC3 afecta significativamente el ciclo celular, mayormente en la transición G1/S. En este sentido la sobre-expresión de RAC3 esta asociada al aumento de Ciclina D1, y hemos demostrado que los estrógenos requieren de NF- κ B activo para inducir su expresión en células de tumor de mama donde postulamos que ER, RAC3 y NF- κ B forman un complejo que se une a secuencias κ B en el promotor de esta Ciclina, aumentando su expresión. Además demostramos que NF- κ B activado por TNF induce la proliferación vía un aumento de la expresión de CD1. Por otra parte también se halló una estrecha relación de los niveles de expresión de RAC3 relacionada con la activación de la vía de IGF-1 y modulando los niveles de sus receptores y con otros factores de crecimiento como EGF.

También hemos demostrado que la sobre-expresión de RAC3 protege a las células de la apoptosis inducida por H₂O₂ por un mecanismo que involucra acciones de RAC3 a nivel nuclear pero también citoplasmático, aumentando la actividad de NF- κ B, disminuyendo la actividad de caspasa 9, aumentando la actividad de AKT y p38, e inhibiendo a ERK2 y la translocación del factor apoptótico AIF al núcleo. Describimos por primera vez que RAC3 tiene un rol anti-apoptótico no solo por su conocida acción a nivel genómico, sino por otras acciones a nivel citoplasmático. Posteriormente también demostramos que RAC3 sensibiliza a la apoptosis inducida por señales de membrana por TRAIL en la línea de leucemia humana K562 que sobre-expresa RAC3 y es resistente al tratamiento. Estas células tienen NF- κ B sobre-activado y una vez disminuidos los niveles de RAC3 con RAC3-RNAi se volvieron sensibles a la acción apoptótica de TRAIL, aumentaron el número de receptores de TRAIL, y disminuyeron su actividad NF- κ B. Otras evidencia del rol protector de la apoptosis de RAC3 fueron reportadas posteriormente por otros grupos.

En suma también se ha correlacionado a RAC3 con el aumento de Smad-2 y marcadores de TEM. Y su sobre-expresión aumenta la expresión de múltiples metaloproteasas en líneas celulares de tumor de mama y próstata. En este

sentido nuestro laboratorio demostró que el solo aumento en la expresión RAC3 en células no tumorales HEK293 aumenta significativamente la proliferación en ausencia de suero, y además estas células adquieren características tumorales, como crecimiento independiente de anclaje formando colonias en *soft agar*.

Por otra parte es creciente la evidencia que apunta al rol clave de RAC3 en la respuesta inflamatoria. El hecho de que RAC3 sea coactivador de factores de transcripción fundamentales en la respuesta pro- y anti-inflamatoria como NF- κ B, y GR, tal vez indicaba que pequeños cambios en sus niveles de expresión o activación podrían repercutir significativamente en la misma. Una vez más el rol de esta molécula en la respuesta inflamatoria no es estrictamente relacionado con su función de coactivador de NRs, más aun RAC3 resultó ser un factor importante en la protección frente al shock endotóxico letal en la respuesta inflamatoria aguda modificando los niveles de citoquinas pro-inflamatorias y a nivel traduccional con una nueva función a nivel citoplasmático. Posteriormente, se demuestra que RAC3 también es fundamental en la modulación de la inflamación local y sistémica, en la eliminación bacteriana y en el desarrollo de la inmunosupresión post fenómeno inflamatorio sistémico.

Por otro lado como se desarrolló en la Introducción actualmente se sabe que la vía mTOR se encuentra frecuentemente desregulada en tumores, en este sentido el inhibidor de esta vía, la Rapamicina utilizado como inmunosupresor en individuos trasplantados, ha mostrado además tener acciones anti-tumorales. Como hemos descrito la vía mTOR posee innumerables interconexiones con numerosas vías y cascadas tumorales relacionadas también con el rol oncogénico de RAC3 y en suma se ha reportado en un modelo *in vivo* la relación entre la sobre-expresión de RAC3 y esta vía.

Referente a la regulación de los niveles de expresión de RAC3, si bien otros autores demostraron que E2F es capaz de aumentar su expresión y otros a su vez que también puede ser regulada por STAT6 ninguno de estos hallazgos clarifica si es unívoco para la vía de un solo factor de transcripción o un conjunto de señales al unísono. Tampoco queda claro si la desregulación de RAC3 en estos casos es consecuencia o causa de la tumorigénesis o bien acompaña al desarrollo tumoral.

Por todo lo aquí descripto resulto muy importante investigar los mecanismos involucrados en la regulación de la expresión de RAC3 y continuar investigando su relación con el desarrollo tumoral en sus diferentes etapas y observándolo desde una perspectiva más amplia valiéndonos de los antecedentes mencionados.

LA HIPÓTESIS

La hipótesis principal cuando se comenzó este trabajo de tesis fue:

“La sobre-expresión de coactivadores tiene un rol en tumorigénesis, que no solo involucra a receptores de hormonas esteroideas por cuya interacción fueron originalmente identificados, sino también a citoquinas y señales de estrés vía otros factores de transcripción. Por tal razón, tanto hormonas como citoquinas y señales de estrés, a través de diferentes cascadas de transducción de señal y la activación de diferentes factores de transcripción y receptores nucleares, podrían regular la expresión de los coactivadores que utilizan.

Muy probablemente, se utilicen mecanismos de retroalimentación negativa, que cuando fallan llevan a un descontrol en la expresión y actividad de coactivadores”.

De acuerdo con esta hipótesis es que se plantearon los siguientes objetivos de trabajo.

OBJETIVO PRINCIPAL

El objetivo principal de este trabajo de tesis fue determinar los mecanismos moleculares que regulan la expresión de RAC3 miembro de la familia de coactivadores de p160, su asociación con los distintos factores de transcripción, la

asociación de complejos con promotores específicos, sus actividades enzimáticas y sus efectos en la tumorigénesis y el desarrollo tumoral.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Determinar si la respuesta inflamatoria es capaz de regular los niveles de expresión de RAC3 tanto *in vivo* como *in vitro* y los mecanismos moleculares involucrados.
- 2 Dado que la autofagia cumple una función importante en la supervivencia tumoral, determinar si la sobre-expresión de RAC3 tiene algún rol en la autofagia

MATERIALES Y MÉTODOS

"Try again, fail again. Fail better"
Samuel Beckett

I. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Todas las secuencias nucleotídicas utilizadas fueron obtenidas del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) consultando la base de datos adecuada en cada caso.

Para los análisis de secuencias nucleotídicas y construcción digital de clonados, análisis de sitios de restricción y otros; se utilizaron los programas VECTOR NTI (*Invitrogen*) y *Geneious* (*Biomatters*). Para el diseño de *primers* se utilizó el programa *PearlPrimer*. Con el objetivo de buscar secuencias nucleotídicas conservadas evolutivamente se usó el programa *online ECR browser* (<http://ecrbrowser.dcode.org/>) contra bases de datos de ocho especies de mamíferos altamente relacionados evolutivamente a la especie humana. Para la búsqueda de posibles etiquetas de pegado blanco de distintos factores de transcripción se utilizaron los programas VECTOR NTI y los programas online *MatInspector* de *Genomatix*, *Alibaba 2.0*, *ConSite*, entre otros. Se seleccionó aquellos sitios putativos con mayor *score*.

II. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS UTILIZADOS CON ÁCIDOS NUCLEICOS

II. i. VECTORES DE EXPRESIÓN Y PLÁSMIDOS REPORTEROS

Para el desarrollo de este trabajo de tesis se utilizaron numerosas construcciones plasmídicas que se describen a continuación:

→ **pRC-I κ Bss**: se utilizó en los experimentos donde se inhibió específicamente al factor de transcripción NF- κ B. El vector de expresión contiene la forma mutada del I κ B α en los aminoácidos Ser32 y Ser36 impidiendo su fosforilación y posterior proteólisis, necesaria para

desprenderse de NF- κ B y permitirle migrar al núcleo. Lo hemos utilizado en publicaciones de trabajos realizados en nuestro laboratorio ^[227, 284, 361].

→ **pRC-RelA:** se utilizó en los experimentos donde se evaluó el efecto del aumento en la actividad del factor de transcripción NF- κ B. El vector de expresión contiene el factor de transcripción RelA humano ^[227] y también los hemos utilizado previamente ^[227, 361, 362].

→ **MMTV-Luc:** se usó para determinar el efecto sobre la actividad del glucocorticoide sintético Dexametasona (Dex) empleado y en ensayos luminométricos para evaluar el efecto de la modificación de los niveles de expresión de RAC3 sobre su actividad. El plásmido reportero contiene el gen de la Luciferasa bajo el control de los elementos respondedores a glucocorticoides (GRE) ^[46].

→ **κ B-Luc:** se utilizó para medir actividad del factor de transcripción NF- κ B, ya que el plásmido reportero contiene etiquetas blanco de κ B río arriba del gen de Luciferasa, ha sido empleado en trabajos del laboratorio ya publicados ^[46, 227].

→ **RSV- β -gal:** se utilizó como control de eficiencia de transfección para la posterior normalización de las unidades relativas de luz (U.R.L) en todos los ensayos reporteros. Se trata del vector de expresión para la proteína β -galactosidasa que se encuentra bajo el control del promotor de actividad constitutiva del virus de Sarcoma de Rous (RSV), que fue agregado a la mezcla de transfección en mínimas proporciones ^[227].

→ **pCMX-HA-RAC3:** se usó para los experimentos de sobre-expresión del coactivador RAC3, el gen se encuentra bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV). Como vector vacío control se utilizó el plásmido pCMX (Invitrogen) ^[227, 228]. En algunos experimentos se utilizó también: el vector de expresión RAC3 Δ NLS que corresponde al vector de expresión de RAC3 con la etiqueta de translocación nuclear mutada SRC3-K17A/R18A ^[361].

- **RNAi-RAC3:** se trata de una construcción de nuestro laboratorio realizada en el vector p-*Silencer* 1.0-U6 de Ambión donde se clonó el oligo RAC3-RNAi ya utilizado en trabajos publicados ^[284] y como control se utilizó un ARN “*scrambled*”.
- **RFP-LC3:** se usó para detectar células en autofagia, ya que el vector lleva el fluorocromo de la proteína fluorescente roja fusionado a LC3 un marcador específico de autofagosomas ^[361].
- **pGEM-T-easy:** (*Promega*) sistema de clonado basado en la actividad nucleótido transferasa propia de la Taq ADN polimerasa. El vector se encuentra previamente linearizado con EcoRV y presenta un nucleótido de deoxitimidina en cada extremo 3'. La ligación de los fragmentos de PCR ocurre con elevada eficiencia por complementaridad de bases a productos de la enzima Taq ADN polimerasa que deja extremos con deoxiadenina. La inserción del fragmento clonado interrumpe el fragmento que codifica para la subunidad α de la enzima beta galactosidasa, permitiendo la identificación de colonias recombinantes de color blanco en placas con el colorante “X-Gal”. El plásmido se utilizó para el subclonado del fragmento de la zona 5' regulatoria del gen de RAC3.
- **pGL3-basic:** se trata de un plásmido que contiene el gen de la enzima Luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) con un sitio de multiclonado río arriba donde se puede clonar la secuencia regulatoria a analizar, evaluando su actividad transcripcional mediante ensayos reporteros, al transfectarlo en células eucariotas de manera rápida, sensible y cuantitativa. Lo hemos usado en publicaciones previas ^[227]. En este caso se clonó el fragmento de 2312pb de la zona regulatoria 5' del gen de RAC3, (*Promega*).
- **promRAC3-Luc:** se utilizó para investigar la expresión de RAC3 a nivel transcripcional y observar el efecto de distintos estímulos o factores de transcripción a nivel del promotor de RAC3. El plásmido reportero se construyó de la siguiente manera:

Un fragmento de 2312pb de la secuencia regulatoria 5' del gen de RAC3 humano *ncoa3*, ubicada entre el sitio -1970 a +335 del primer exón se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la enzima polimerasa Taq *Accuprime* HF (*Invitrogen*). La mezcla de reacción se preparó según indicaciones del proveedor, más el agregado de 5% dimetilsulfoxido (DMSO) para facilitar el despliegue de los *primers*, que por tener como blanco una secuencia regulatoria poseen alto contenido de CG. La PCR se realizó en un termociclador *Eppendorf* con el programa de ciclado que se detalla en la tabla 3.

Como molde se utilizó el ADN del cromosoma artificial de bacteria (BAC) perteneciente al clon humano RP11-456N23 (*GenBank* accession no. AL353777; *Invitrogen*, *Carlsbad*, CA, USA). El par de *primers* utilizado fue FW: CGGGGTACCTTTTAGTAGAGACGGGGTTTCGC; y RV: TTTCTCGAGCCAGCTTCGTCTCAGCTCCTAC.

La banda de 2312pb se purificó por electroforesis en gel de agarosa 0,8% mediante el *kit* de purificación *Amersham* (*Illustra*TM/*GFX*TM PCR DNA and GEL BAND, *Biosciences*). Luego se incubó a 72°C en el termociclador por 15 minutos en una mezcla conteniendo la enzima Taq polimerasa recombinante (*Invitrogen*), deoxi-ATP y su *buffer* con la concentración de magnesio recomendada por el fabricante con el fin de agregar dATP a los extremos y así subclonarlo en el vector pGEM T-easy (*Promega*, *Madison*, WI, USA), según indicaciones del fabricante. Se transformaron bacterias quimiocompetentes con la mezcla y se plaquearon en LB-agar con ampicilina toda la noche a 37°C, junto a los controles correspondientes. Se seleccionaron las colonias crecidas y se realizó la purificación del ADN a pequeña escala.

Se analizaron los clones obtenidos cortándolos con la enzima de restricción *HindIII*, debido a que este sitio de corte es solo aportado por el inserto. Se seleccionó un clon positivo y se digirió con las enzimas de restricción *KpnI* y *XhoI* (*Promega*) en *buffer* C (*Promega*) liberando el

fragmento que fue ligado con la enzima T4 ligasa (*BioLabs*) 3 horas a 14°C con 100ng del vector reportero pGL3-*basic* (*Promega, Madison, WI, USA*) previamente digerido con las mismas enzimas, en una relación 6:1 indicada por:

$$\text{ng INSERTO} = \frac{(\text{ng VECTOR} \times \text{kb INSERTO}) \times \text{Relación Molar}}{\text{kb VECTOR}}$$

La mezcla se inactivó 10 minutos a 65°C y se transformó en bacterias quimiocompetentes que se plaquearon en placas LB-agar con ampicilina. Se picaron las colonias crecidas y se realizó la extracción del ADN a pequeña escala. Se analizaron los clones obtenidos seleccionando aquellos con patrones de corte y tamaños esperados mediante el corte con enzimas de restricción, a saber: dos fragmentos de 6049 y 1055pb con HindIII, tres fragmentos de 4446, 2569 y 109pb con BamHI, un fragmento de 7104pb con EcoRI (sitio que solo aporta el inserto) y finalmente la liberación del inserto con las enzimas que se clonó: KpnI y XhoI. Se seleccionó uno de los clones positivos y su secuencia nucleotídica fue verificada por secuenciación. La construcción obtenida se ve en la Figura 20.

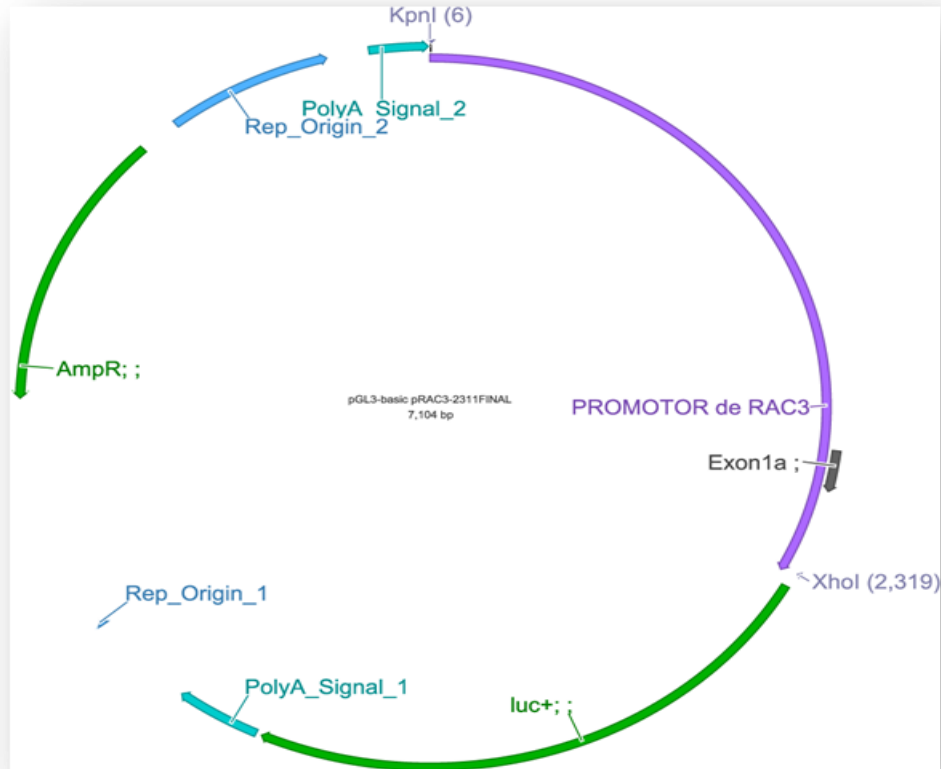


Figura 20. Esquema representativo de la construcción promRAC3-Luc. La Figura muestra la construcción realizada donde se clonó direccionalmente en el sitio de multiclonado con las enzimas KpnI y XhoI un fragmento de 2312pb del promotor de RAC3 río arriba del gen de la Luciferasa como se ve en la Figura, nótese la ausencia de cualquier otra secuencia regulatoria eucariota.

Programa de ciclado		
94°C	30 segundos	Desnaturalización inicial
94°C	30 segundos	25 ciclos
56°C	30 segundos	
68°C	3 minutos	
68°C	10 minutos	Extensión final

Tabla 3. Programa de ciclado utilizado para amplificar la secuencia regulatoria 5'- gen de RAC3

II. ii. PREPARACIÓN DE BACTERIAS QUIMIOCOMPETENTES

Las bacterias quimiocompetentes se utilizaron en todos los ensayos donde se quiso transformar un producto de clonado o transformar algún plásmido con el fin de almacenarlo o amplificarlo para su uso. Se utilizó la cepa de *Escherichia Coli* DH5 α y se seleccionaron las preparaciones con una eficiencia de transformación igual o superior a 10⁶ UFC/ug ADN.

Para obtenerlas se utilizó un protocolo de tres días. Día 1: se plaquearon las bacterias por estriado en SOB-agar y se incubó toda la noche a 37°C. Día 2: se picaron colonias de 2-3mm de diámetro y se crecieron en 12,5ml de SOB 6-8 horas con agitación vigorosa (250-300rpm) como cultivo *Starter*. Se inocularon erlenmeyers con 125ml de SOB, con 1,2 y 5ml de Starter, e incubaron a 20°C con agitación moderada por 14 horas (aproximadamente). Día 3: Se midió la absorbancia de cada erlenmeyer hasta que se obtuvo la densidad óptica a 600nm (DO₆₀₀) de 0,55 y ésta se mantuvo (se monitoreó cada 45 minutos). Se transfirió el cultivo a hielo por 10 minutos, se centrifugó a 4°C por 10 minutos a 3900rpm, se extrajo el medio por aspiración con bomba y volcado en papel absorbente. El *pellet* resultante se resuspendió gentilmente en 40ml de *buffer* de transformación INOUE frío y se centrifugó a 3900rpm por 10 minutos a 4°C, retirando el medio nuevamente con papel absorbente. Se resuspendieron las bacterias en 10ml de *buffer* de transformación frío, y se agregó 750ul de DMSO (calidad HPLC). Se mezcló por movimientos circulares con un *tip* y se colocó en hielo por 10 minutos. Muy rápidamente se alicuotó en microtubos de a 100ul y previo congelamiento a -80°C se llevó a nitrógeno líquido. Se chequeó la eficiencia de transformación con un plásmido de referencia de concentración conocida, en distintas diluciones, y como control se plaquearon bacterias no transformadas.

SOB (1L) pH 7

20g	Triptona
5g	Extracto de levadura
0,5g	NaCl
10ml	KCl 250mM
*Luego de autoclavar agregar 5ml de MgCl ₂ 2M	

BUFFER DE TRANSFORMACIÓN INOUE

(Filtrado 0,22um)

MOPS (PH 6.7)	10mM (filtrado)
MnCl ₂ 4H ₂ O	55mM
CaCl ₂ 2H ₂ O	15mM
KCl	250mM

II. iii. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS

Para la preparación de todos los plásmidos utilizados en este trabajo, se transformaron 100ul de bacterias quimiocompetentes *Escherichia coli* DH5 α con 10ul de la mezcla de ligación, o 2ul del ADN de interés en cada caso.

Se incubaron las bacterias por 15 minutos en hielo y luego a 42°C por 90 segundos. Se agregó 1ml de LB sin antibiótico y se incubó durante 45 minutos a 37°C con el fin de que se exprese la resistencia que posee el plásmido.

Luego se sembraron 100ul del LB con las bacterias transformadas en placas de Petri con LB-agar suplementado con el antibiótico adecuado en cada caso con el fin de seleccionar cada clon acorde a la resistencia adquirida.

Cada cultivo se incubó toda la noche a 37°C. Al día siguiente se picaron las colonias obtenidas e incubaron en 5ml de medio LB con el agente selector, por 12

horas en agitación a 37°C. Finalmente se procedió a la purificación y chequeo del plásmido a pequeña escala.

LB (<i>Luria-Bertani</i>)	
10g/l	Triptona
5g/l	Extracto de levadura
5g/l	NaCl
LB-agar	
LB + 15g/l de agar	

II. iv. PREPARACIÓN DE ADN A PEQUEÑA ESCALA

Se utilizó el método de lisis alcalina modificado de *Birnboim and Doly, 1979* ^[363] para el almacenaje o amplificación para chequeo o uso de todos los plásmidos o vectores de esta tesis

Para ello, bacterias crecidas en LB con el agente selector adecuado fueron centrifugadas a máxima velocidad por 1 minuto. El precipitado bacteriano se resuspendió en 100ul de solución de resuspensión (1) durante 5 minutos a temperatura ambiente, luego se agregó 200ul de solución de lisis (2), se mezcló por inversión y se incubó 5 minutos en hielo, seguidamente se adicionó 150ul de solución neutralizante (3), se mezcló por inversión e incubó 5 minutos en hielo. Se centrifugaron los microtubos a 10000rpm por 5 minutos. Al sobrenadante se le agregó 5ul de RNAsa (10mg/ml) y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.

Luego se agregó un volumen de cloroformo: 24/isoamílico: 1, se agitó y se dejó reposar, para optimizar la separación de las fases, luego se centrifugó 5 minutos a 10000rpm.

A la fase acuosa extraída se le agregó 2,5 volúmenes de etanol 100% y se dejó precipitando 3 horas a -20°C, tras lo cual se centrifugó a 10000rpm 10 minutos. El ADN precipitado se lavó con 1 ml de etanol 70% v/v y se volvió a

centrifugar. Una vez evaporado el etanol, el plásmido fue resuspendido en 20ul H₂O microfiltrada.

SOLUCIÓN RESUSPENSIÓN (1)

50mM	Glucosa
50mM	Tris-HCl pH 8,0
10mM	EDTA pH 8,0

SOLUCIÓN DE LISIS (2)

1% p/v	SDS
20mM	NaOH

SOLUCIÓN NEUTRALIZANTE (3)

3M	Acetato de Potasio, pH 5,5
----	----------------------------

II. v. PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO A GRAN ESCALA

Los plásmidos utilizados en la calidad y cantidad necesaria para transfectar líneas celulares en cultivo fueron preparados por medio del sistema de maxi preparaciones de *Qiagen*, para lo que se siguieron todos los pasos que se indican en el protocolo provisto por el proveedor. Se utilizaron columnas *Qiagen-tip* 500, con un rendimiento de 1ug/ul.

a. PURIFICACIÓN DEL CROMOSOMA ARTIFICIAL DE BACTERIA RP11-456N23

El cromosoma artificial de bacteria (BAC) RP11-456N23 que se utilizó como molde para levantar mediante PCR el fragmento de 2312pb del promotor del gen de RAC3 (mencionado previamente en esta sección) fue purificado utilizando el protocolo y las soluciones de *Qiagen* modificado de *Biotechniques* 27:72-74 (1999).

Para ello se crecieron bacterias con un inóculo inicial de 1ml toda la noche en LB más cloranfenicol (antibiótico selector) en una concentración de 12,5g/ml a 37°C en agitación, se centrifugó 15 minutos a 3000rpm a 4°C en centrifuga SORVAL.

Se resuspendió el pellet en 100ml de *buffer* P1 y se agregó 100ml de *buffer* P2, invirtiéndose suavemente 4-6 veces y se dejó 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregó 100ml de *buffer* P3 frío, se mezcló por inversión suave 4-6 veces y se dejó 20 minutos en hielo, se centrifugó a 10000rpm a 4°C, se tomó el sobrenadante, se filtró y se purificó por columna *tip-500* previamente equilibrada según indicaciones del fabricante, con la modificación de que en la elución final se utilizó solución QF a 65°C (5 veces por 3ml).

Finalmente se precipitó el ADN con 10,5ml de isopropanol, se centrifugó a 10000rpm a 4°C, se lavó el pellet de ADN con 5ml de Etanol 70%, se dio un spin de 10000rpm por 15 minutos y se secó. El pellet se resuspendió vigorosamente en 60ul de agua ultrapura, ya que debido a su tamaño puede ser dificultoso de resuspender.

II. vi. CUANTIFICACIÓN DE ADN Y ARN

Las concentraciones de ADN y ARN usadas en este trabajo se cuantificaron midiendo la absorbancia a una longitud de onda de: 260nm en el espectrofotómetro (*GeneQuant, Pharmacia*). La concentración se calculó utilizando el factor de conversión basado en el coeficiente de extinción para cada ácido nucleico (A_{260} of 1.0 = 50µg/ml para ADN doble cadena y 40µg/ml para ARN) y multiplicando por el factor de dilución empleado en cada medición. Por otro lado se leyó la absorbancia a 280nm para detectar la presencia de aminoácidos aromáticos que evidencian la presencia de proteínas, y la absorbancia a 230nm para determinar la presencia de contaminantes o productos no deseados de la extracción. Luego se calculó la relación A_{260}/A_{230} deseándose mayor a 1.7. En el caso de las muestras de ARN también se leyó absorbancia a 320nm como

indicador de la dispersión de luz, que fue restado al resto de las lecturas obtenidas, previo a la realización de los cálculos.

II. vii. GELES NATIVOS DE AGAROSA

Para preparar los geles de agarosa utilizados en los experimentos con ADN se disolvió agarosa por ebullición en *buffer* TAE 1X. Los porcentajes de agarosa usados fueron entre 1% y 1,5% dependiendo del tamaño de banda a observar. Una vez tibio se agregó 0,5µg/ml de bromuro de etidio (*Invitrogen*). La electroforesis se realizó a voltaje constante entre 5-10V/cm.

La muestra a sembrar se resuspendió en *buffer* de siembra preparado con glicerol 30% v/v, azul de bromofenol y xilencianol. Los geles fueron visualizados bajo luz UV en transiluminador y fotografiados con cámara digital (Kodak).

TAE 1L	
5g/l	Tris-base
1ml	Acético glacial
1ml	EDTA 0,5M pH 8

II. viii. PCR EN TIEMPO REAL (RT-qPCR)

Para obtener los niveles de mensajero de los distintos genes analizados, los lisados celulares o el homogenato de bazo se trataron con 1ml de TRIzol, (*Invitrogen*) según recomendaciones del fabricante, luego se agregó 100ul de cloroformo y se agitó 30 segundos. Seguidamente se extrajo la fase acuosa y se precipitó el ARN total, se resuspendió y se determinó su concentración.

Luego se tomó 1ug de muestra y se trató con DNasa I 15 minutos a 37°C, se frenó la reacción agregando la solución “*Stop*”.

La transcripción reversa se realizó en una mezcla conteniendo 1ul de mix de dNTPs 10mM, 1ul oligo(dt)₂₅, *buffer*, 1ul DTT 1M, 1ul *RNasa* OUT y 1ul de Transcriptasa reversa *SuperScript II (Invitrogen)* en un volumen final de 20ul con agua libre de DNasas y RNasas. La síntesis del ADN copia se realizó en un termociclador *Eppendorf*, según instrucciones del fabricante 10 minutos a 25°C, 50 minutos a 37°C y 15 minutos a 70°C.

El ensayo de RT-qPCR se hizo con el ADN copia procedente de 50ng de cada muestra de ARN llevados a un volumen constante en presencia del intercalante de ADN SYBR *green 2x (Bio-Rad)*. Cada muestra se amplificó por triplicado.

La cuantificación se realizó con los *primers* mostrados en la tabla 6 para cada caso. Los niveles de expresión específica de un ARNm fueron normalizados contra un ARNm “*housekeeping*”. Los resultados son expresados en cantidades de veces con respecto al control.

Los *primers* hRAC3, hGADPH, mRAC3 y mActina se diseñaron con el programa *PearlPrimer*. La PCR fue previamente estandarizada con una curva de ADN copia con diluciones seriadas 1/10 para cada transcripto blanco con el fin de determinar la cantidad relativa de secuencias amplificadas con los respectivos *primers*. Los datos se analizaron con el programa *iCycler IQ (BioRad, Hercules, CA, USA)*, donde se chequearon las curvas de *melting* obtenidas para cada muestra luego de la PCR.

a. PRIMERS ARN MENSAJERO HUMANOS

GEN	PRIMERS	
hRAC3	<i>Forward</i>	5'-AAGTGAAGAGGGATCTGGA-3'
	<i>Reverse</i>	5'- CAGATGACTACCATTGAGG-3'
hGADPH	<i>Forward</i>	5'-TCTCCTCTGACTTCAACAGC-3'
	<i>Reverse</i>	5'-GTTGTCATACCAGGAAATGA-3'

b. PRIMERS ARN MENSAJERO RATONES

GEN	PRIMERS	
mIL-6	Forward	5'-CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA-3'
	Reverse	5'-GCAAGTGCATCATCGTTGTTTCATAC-3'
mIL-1 β	Forward	5'-CAACTGTGAAATGCCACC-3'
	Reverse	5'-GTGATACTGCCTGCCTGA-3'
mTNF	Forward	5'-AAGCCTGTAGCCCACGTCGTA-3'
	Reverse	5'-GGCACCAGTAGTTGGTTGTCTTTG-3'
mRAC3	Forward	5'-ACATGGTG CATATGAACAGC-3'
	Reverse	5'-GATGTCAGCAGTATTTCTGATCG-3'
m- β -Actina	Forward	5'-GCCAACCGTGAAAAGATGAC-3'
	Reverse	5'- ACATGGCTGGGGTGTTGAA-3',

Tabla 4. *Primers* utilizados en las distintas RT-qPCR.

III. TÉCNICAS, PROCEDIMIENTOS Y REACTIVOS EMPLEADOS EN CULTIVOS CELULARES

III. i. CULTIVOS CELULARES HUMANOS UTILIZADOS

En el transcurso de esta tesis se utilizaron diversas líneas celulares humanas de distintas características de acuerdo a los objetivos a desarrollar en los experimentos, teniendo presente su caracterización en lo referente a los niveles de expresión de RAC3 (Figura 21) y en otros casos por su alta eficiencia de transfección.

LÍNEA CELULAR	CARACTERÍSTICAS	TIPO
HEK293	Riñón embrionario humano	Epitelial / embrionaria
T47D	Carcinoma ductal humano	Epitelial / tumoral
K562	Leucemia mieloide crónica (LMC) humana	Linfoblasto / tumoral
Lovo	Adenocarcinoma colorectal humano	Epitelial / tumoral
T84	Carcinoma colorectal humano	Epitelial / tumoral
HCT116	Carcinoma colorectal humano	Epitelial / tumoral

Tabla 5. Líneas celulares humanas utilizadas en este trabajo de tesis

Las células HEK293 se mantuvieron en medio esencial mínimo modificado de *Dulbecco* (DMEM) alta glucosa (*GIBCO Laboratories, Grand Island, NY, USA*). La línea K562 en medio RPMI 1640 (*GIBCO*). Por otro lado las líneas T47D, T84, Lovo y HCT116 se mantuvieron con medio esencial mínimo *Dulbecco* modificado con medio *Eagle F12* (DMEM/F12) (*Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA*). Todas las líneas celulares se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Se suplementó los medios con 10% de suero fetal bovino (previamente deplementado por 30 minutos a 56°C en baño termostático), penicilina (100U/ml), estreptomicina (100µg/ml) y Gentamicina (500µg/ml).

Las líneas HEK293, T47D, T84, Lovo y HCT116 se mantuvieron en placas plásticas estériles de 10cm y se repicaron con tripsina (0,25% p/v y 1mM EDTA en PBS), cada 3 días aproximadamente.

La línea K562 se mantuvo en botellas plásticas estériles de 50ml y se repicó a una densidad 1×10^5 células/ml cada 3 días aproximadamente.

Las líneas celulares de repiques jóvenes y en crecimiento exponencial se criopreservaron previamente resuspendidas en SFB-5% DMSO, bajo enfriamiento lento hasta -80°C o en tanque de nitrógeno.

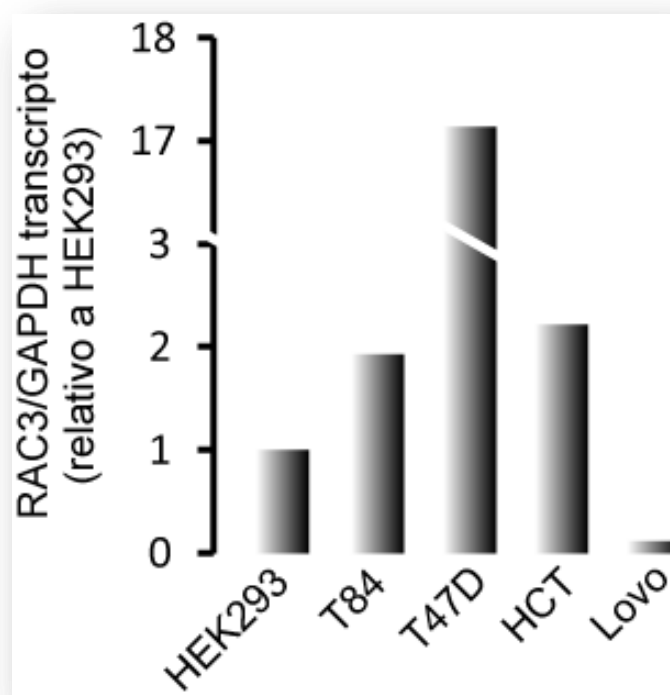


Figura 21. RT-qPCR contra RAC3 de algunas líneas celulares utilizadas. Expresión del ARN mensajero de RAC3 determinada RT-qPCR sobre distintas líneas tumorales. El diagrama de barras muestra el promedio obtenido de RAC3 normalizado con GAPDH relativos a la línea no tumoral HEK293.

III. ii. PRINCIPALES REACTIVOS EMPLEADOS COMO ESTIMULO O TRATAMIENTO EN LOS EXPERIMENTOS EN CULTIVO

Reactivo	Origen	Concentración
TNF	SIGMA	10 a 20ng/ml
Dexametasona	SIGMA	250 a 500nM
Sulfazalacina	IVAX	200um
Mifepristona (RU486)	SIGMA	100nM
Rapamicina	Novartis	50 a 100nM 500nM
SB203580	SIGMA	20 uM

Tabla 6. Principales reactivos utilizados en los experimentos sobre cultivos celulares de este trabajo de tesis.

III. iii. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS EN CULTIVO

a. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA UTILIZANDO EL REACTIVO *Lipofectamine*TM.

Se utilizó para transfectar la línea celular HCT116 con el fin de disminuir sus niveles de RAC3 endógenos y para realizar ensayos reporteros (ver Resultados)

Algunas líneas celulares como HCT116 presentan muy baja eficiencia de transfección (menos del 30%). Existen diversos métodos que utilizan sistemas de liposomas comerciales que favorecen la incorporación de ADN foráneo para este tipo de células.

Se siguieron los pasos recomendados en el protocolo del reactivo *Lipofectamine*TM (Gibco) para líneas celulares adherentes. Las células se crecieron en placas de 24 pocillos a una densidad de 1×10^5 células/pocillo en DMEM sin suero ni antibióticos, y fueron transfectadas transitoriamente con una

masa total de 800ng de ADN. El medio de transfección fue reemplazado por medio DMEM/F12 fresco y completo (10 % suero fetal bovino más antibióticos) luego de 5 horas.

b. TRANSFECCIÓN POR EL MÉTODO DE CLORURO DE CALCIO

El método que se utilizó para transfectar transitoriamente células HEK293 fue el de cloruro de calcio, dado que tienen una eficiencia de incorporación de ADN foráneo del 95% en por este método. Por este motivo se puede asumir que cuando se analizan cambios en los niveles de proteínas específicas o la proliferación/supervivencia en respuesta a altos o bajos niveles de expresión de los genes transfectados, estamos refiriéndonos representativamente a más del 90% de la población celular.

Este procedimiento se basa en la formación de un precipitado de ADN-fosfato de calcio, que facilita la interacción del ADN con la superficie celular ingresando a la célula por endocitosis. El ADN se mezcla directamente con una solución concentrada de CaCl_2 (tubo A), la cual luego es goteada al *buffer* fosfato (tubo B) bajo burbujeo constante, este procedimiento favorece la formación del precipitado de tamaño adecuado para que el ADN sea incorporado a la célula con mayor eficiencia. La mezcla A + B se incuba 30 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se gotea sobre las células a las que a las 5 horas se le cambia el medio de cultivo por medio fresco.

MEZCLA DE TRANSFECCIÓN 10X

ADN - CaCl_2 (Tubo A)		HeBs 2x - pH 7,12 (Tubo B)	
5 $\mu\text{g/ml}$	ADN/ H_2O	50mM	HEPES
		280mM	NaCl
250mM	CaCl_2	1,5mM	Na_2HPO_4

Para cada ensayo se utilizó un protocolo de transfección adecuado a los requisitos del mismo:

- En los ensayos de sobre-expresión de una determinada proteína para evaluar proliferación/supervivencia, se sembraron 8×10^5 células/placa de 10cm, con 9ml de medio DMEM, a las 24 horas se agregó 1 ml de la mezcla de transfección, se cambió por medio fresco a las 5 horas y a las 24 horas posteriores las células fueron repicadas, sembrándose 8×10^3 células/pocillo en una placa de 96 pocillos para proliferación y $1,5 \times 10^4$ células/pocillo para supervivencia.
- En los ensayos de modificación de la expresión de proteínas por sobre-expresión exógena de un determinado gen, las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos (5×10^5 células/pocillo) en 1ml de medio DMEM y se procedió de manera similar con las células sembradas en placa de 10cm. Los cultivos fueron estimulados según se indica en la sección Resultados.
- En los ensayos reporteros las células se sembraron en placa de 24 pocillos, a una densidad de 5×10^4 células en 500ul de medio por pocillo. A las 24 horas se transfectaron con 200ng de ADN/pocillo (150ng del vector con el gen a sobre-expresar o vector sin inserto, 40ng del vector reportero y 5ng del vector RSV- β -gal).

c. CONTROL DE TRANSFECCIÓN

Dado que para los experimentos que involucran transfecciones que no corresponden a ensayos de genes reporteros se requiere que la población celular sea representativa del cambio introducido por transfección, se utilizó el plásmido de expresión constitutiva para la enzima β -galactosidasa en una proporción mínima en la mezcla de transfección para estandarizar el porcentaje de células que incorporaron el plásmido: positivas en color azul para la reacción con el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D-galactopiranosida (X-gal). Se trabajó con una eficiencia superior al 90 %.

Solución X-Gal	
0,2%	X-Gal (en el momento)
2mM	MgCl ₂
5mM	K ₄ Fe(CN) ₆ 3H ₂ O
5mM	K ₃ Fe(CN) ₆

III. iv. INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA

Para evaluar el posible rol de RAC3 en la autofagia se utilizaron distintos modelos de inducción.

- **Ayuno:** para la autofagia inducida por ayuno se incubaron las células en medio EBSS (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA) sin SFB o Glutamina por 6 horas. En todos los casos en paralelo se incubó a las células con medio completo (MC).
- **Inhibición farmacológica de la vía mTOR:** en los casos que se detalla se indujo la autofagia con el inhibidor de la vía mTOR Rapamicina en una concentración 0,5uM por 6hs. En paralelo se incubó las células con medio completo (MC) y diluyente de Rapamicina.
- **Hipoxia:** las células se sometieron a condiciones de 2% O₂, colocándolas en el incubador (*Oxoid Ltd., Basingstoke, UK*) con su reactivo a 37°C. Se controló la hipoxia con el viraje de color de la banda indicadora del *kit*. Como condición control los cultivos se incubaron en estufa a 37°C bajo condiciones normales en los tiempos indicados en la sección Resultados.

a. MONITOREO DE LA AUTOFAGIA

Para evaluar los niveles de células autofágicas por microscopía de fluorescencia se incubaron las células con el fluorocromo monodancylcadaverina (MDC) que marca vesículas ácidas como los autofagosomas ^[364] y se determinó el porcentaje de células que evidenciaban tinción, se determinó la autofagia contando un mínimo de 200 células por *Slide*.

En otros experimentos se contaron las células positivas (rojas) previamente transfectadas con el vector RFP-LC3 (marcador específico de autofagosomas), donde se contabilizó cantidad de células.

Por otro lado también se determinó la conversión de LC3 por *western blot* en presencia o no de inhibidores de proteasas 10ug/ml de E64D y pepstatina A - lisosomal, previo a la inducción de la autofagia por ayuno (EBSS), Rapamicina o hipoxia. En estos ensayos se determinó la relación LC3II/LC3I y se relativizó contra la proteína de expresión constitutiva Tubulina. Además se determinó la degradación de p62 que también evidencia la autofagia ^[365] por la misma técnica que fue relativizado con Tubulina.

Adicionalmente las células fueron teñidas con el colorante fluorescente Hoechst para evaluar la posible presencia o no de cuerpos apoptóticos.

IV. TÉCNICAS UTILIZADAS IN VITRO

IV. i. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES REPORTEROS

a. COSECHA DE CÉLULAS Y PREPARACIÓN DE EXTRACTOS

Los ensayos reporteros se realizaron en placa de 24 pocillos donde se transfectaron transitoriamente células con los distintos plásmidos reporteros conteniendo el gen Luciferasa en cada caso (ver Resultados), más el vector RSV- β -Galactosidasa como control interno (en cantidades limitantes). A las 24 horas fueron tratadas con el estímulo indicado en cada caso. Luego del tiempo indicado se lavaron dos veces con PBS, y se agregó 100 μ l de *Reporter Lysis Buffer*

(*Promega*) a cada pocillo por 15 minutos a temperatura ambiente. Se colectó el lisado en microtubos y se centrifugó 5 minutos a 10000rpm. Se tomó el sobrenadante y se separaron 15µl en un microtubo para medir actividad Luciferasa y 50µl en pocillos de una placa de 96 pocillos para medir actividad β -galactosidasa.

b. DETECCIÓN DE ACTIVIDAD LUCIFERASA

El ensayo de actividad de la enzima Luciferasa se realizó agregando 50µl del reactivo *Luciferase Assay System (Promega)* a los 15µl de muestra o de *buffer* de lisis como control (blanco). Rápidamente se colocó el microtubo en el luminómetro (*Triathler, Hidex*) y se tomó la lectura a los 30 segundos para cada tubo. El ensayo se realizó en oscuridad dado que los reactivos son sensibles a la luz.

Las Unidades Relativas de Luminiscencia (U.R.L.) fueron normalizadas según los valores obtenidos en la medición de actividad β -Galactosidasa.

c. MEDICIÓN DE ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA

Para medir la actividad β -Galactosidasa presente en los 50µl de extracto, se agregaron 50µl de *buffer* β -Gal 2X que contiene el sustrato cromogénico ONPG (orto-nitro-fenil-galactósido). Se incubó entre 30-60 minutos a 37°C protegido de la luz. Una vez que la reacción viró de incoloro a color amarillo, se frenó la misma con 150µl de Na_2CO_3 1M. La absorbancia se midió a 405nm en un lector para Elisa.

BUFFER β -GALACTOSIDASA 2X

0,2M	NaH_2PO_4
0,2M	NaH_2PO_4
0,1M	β -Mercaptoetanol
1,33mg/ml	ONPG

IV. ii. ANÁLISIS DE ACTIVIDAD KINASA

La actividad de las SAPKs, se analizó utilizando la técnica de *western blot* utilizando anticuerpos específicos contra las formas de kinasas fosforiladas y no fosforiladas.

a. PREPARACIÓN DE EXTRACTO PROTEICO PARA KINASAS

Las células se lavaron dos veces con TNE con 1mM de PMSF. Luego se lisaron utilizando *buffer* de lisis para kinasas durante 30 min en hielo. Se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos a 10000 rpm. Se trasvasó el sobrenadante a nuevos microtubos para luego tratarlos con *cracking buffer* y sembrarlos en geles de poliacrilamida con el porcentaje adecuado para definir la separación adecuada para distinguir las formas fosforiladas y no.

BUFFER DE LISIS KINASAS

25mM	HEPES pH 7.5
0,3M	NaCl
1,5mM	MgCl ₂
0,2mM	EDTA
1%v/v	Triton X-100
1mM	DTT
0,5%	Vanadato de Sodio
1mM	PMSF
20µg/ml	Leupeptina
0,5mM	Fluoruro de Sodio

IV. iii. **WESTERN BLOT**

a. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS

Las proteínas totales de células en monocapa se obtuvieron a partir de una placa de 10cm o de un pocillo de placa de 6 pocillos al 80% de confluencia.

Las monocapas celulares fueron lavadas 2 veces con PBS, luego se agregó el volumen adecuado (1 o 2ml) de solución TNE fría por 1 minuto, se despegaron las células con rastrillo y se colectaron a microtubos. Se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos a 4°C y el pellet celular resultante se resuspendió con un volumen de pellet de *buffer* de Lisis en hielo por 15 minutos. Luego se centrifugó a 4°C a 10000rpm 10 minutos y el sobrenadante libre de ADN y restos de membranas celulares se trasvasó a nuevos microtubos.

Finalmente se determinó la concentración de proteínas y se desnaturalizó la muestra a 95°C por 5 minutos en cracking *buffer* con SDS y β -mercaptoetanol.

TNE	
10mM	Tris-HCl pH 7,5
1mM	EDTA
150mM	NaCl
<i>BUFFER DE LISIS</i>	
20mM	Tris-HCl pH 6.7
70mM	NaCl
1mM	EDTA
10%	Glicerol
1%	Triton X-100
0,5%	NP-40
1mM	DTT
0,5 mM	PMSF

b. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

Se determinó la concentración de proteínas en cada lisado con el fin de sembrar la cantidad de microgramos de proteína total deseados en cada calle del mini-gel.

La determinación de la concentración se realizó mediante el método colorimétrico de Bradford. Para la preparación de la reacción de Bradford (*BioRad*), el reactivo 5X fue diluido en agua destilada y se sembró 200 μ l de esta dilución en placa de 96 pocillos a la cual se le agregó 1-2 μ l de la muestra a cuantificar. La absorbancia se midió a 595nm en un lector de Elisa. La concentración se determinó por interpolación de la absorbancia en el rango de linealidad del método (0,05-0,5 μ g/ μ l) con una curva estándar de la proteína Albumina sérica bovina pura BSA (0,1-10 μ g), que se realizó en paralelo y en el momento.

c. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE) Y TRANSFERENCIA A MEMBRANA

Las electroforesis en geles de poliacrilamida se realizó utilizando mini-geles discontinuos, entre 6-12% de acrilamida/bis-acrilamida con SDS. Se sembraron de 50 a 100 μ g de proteínas en *Laemmli buffer* y el marcador de peso molecular (*Full range Rainbow, Amersham*) como referencia. La corrida electroforética se realizó en cubas para minigeles (C.B.S. *Scientific Co.*) a 100V utilizando *buffer* de corrida 1X. Una vez terminada la electroforesis los geles se lavaron en *buffer* de transferencia eliminando el exceso de detergente y se transfirió las proteínas por electroforesis a membranas de Polivinilidenofluoruro PVDF (*Amersham*), previamente activadas en metanol 100% por 1 minuto.

La transferencia se realizó en frío 2-3 horas a 100V con el “sándwich” embebido en *buffer* de transferencia 1X. Una vez terminada la transferencia, se tiñó la membrana con *rojo ponceau*, para controlar la transferencia de las proteínas y se escaneó.

d. ENSAYO DE WESTERN BLOT

La membrana se incubó con 5% leche en polvo descremada en T-TBS por 1 hora a temperatura ambiente para bloquear el pegado inespecífico. Luego se realizaron dos lavados de 5 minutos cada uno con T-TBS para quitar el exceso de leche.

Seguidamente se incubó con el anticuerpo primario diluido en T-TBS 0,5% BSA 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C (de acuerdo a lo previamente establecido como óptimo para cada anticuerpo). Se hicieron tres lavados de 10 minutos cada uno con T-TBS, para quitar el exceso del anticuerpo.

Se incubó con el anticuerpo secundario especie específico conjugado con la enzima HRP (peroxidasa de rabanito) por 45 minutos a temperatura ambiente. Luego se hicieron tres lavados de 10 minutos cada uno con T-TBS y un último lavado con TBS (sin *Tween* 20) para eliminar el detergente que interfiere con la reacción quimioluminiscente.

La membrana se cubrió con la solución de luminol (*New England Nuclear, Boston, MA, USA*), luego se colocó en un chasis y por encima de la membrana cubierta de nylon transparente se montó la película radiográfica (AGFA). Se expuso durante 1 a 15 minutos en oscuridad y se reveló con el kit de revelado (AGFA).

BUFFER FOSFATO SALINO (PBS) 10X

2gr	KCl
80gr	NaCl
2gr	KH ₂ PO ₄
6,1gr	Na ₂ PO ₄

BUFFER DE LISIS

50mM	Tris pH 7.5
15mM	HEPES
0,3M	NaCl
2 mM	EDTA
1%	Triton X-100
1mM	DTT
0,5mM	PMSF

LAEMMLI BUFFER 5X

0,3M	Tris-HCl pH 6.8
10%	SDS
40%	Glicerol
0,01%	Bromo fenol azul
20%	β -mercaptoetanol

**BUFFER DE CORRIDA
(TRIS-GLICINA-SDS)**

25mM	Tris Base
250mM	Glicina
0,1%	SDS

ROJO PONCEAU

0,1%	Rojo Ponceau
0,5%	Acido acético

T-TBS	
20mM	Tris pH 7.6
9g/l	NaCl
0,05%	<i>Tween 20</i>

<i>BUFFER DE TRANSFERENCIA</i>	
125mM	Tris
965mM	Glicina
20%	Metanol

IV. iv. ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA

Se realizaron en diversos experimentos de esta tesis (ver sección Resultados) para detectar mediante anticuerpos específicos la localización de RAC3. Para ello se colocaron cubres de vidrios estériles (*Fisherbrand*) en placas de 24 pocillos y se sembraron 5×10^4 células en 500µl de medio de cultivo por pocillo.

Luego del estímulo (indicado en cada caso) se fijaron las células con una solución de 1% Glutaraldehído y 0,2% de Formaldehído. Se lavaron los vidrios (con las células adheridas) 3 veces con PBS y se permeabilizó con 0,2% de Tritón X-100 en PBS por 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavó dos veces con PBS (para quitar el detergente) y luego se bloqueó con 3% BSA en PBS por 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó dos veces con PBS para retirar el exceso de BSA. Seguidamente se incubó toda la noche en cámara húmeda a 4°C con el anticuerpo primario disuelto en 3% BSA/PBS.

Al día siguiente se lavó tres veces 10 minutos con PBS y luego se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado al fluorocromo

Fluoresceína (1/1000 anti-ratón Fitc) una hora, se lavó tres veces con PBS y se montaron los vidrios con una solución 50% glicerol en PBS.

Las imágenes se obtuvieron usando un microscopio de fluorescencia *Olympus* acoplado a una cámara digital.

IV. v. INMUNOHISTOQUÍMICA

Se realizó con el objetivo de evaluar los niveles de expresión y localización de RAC3 en cortes de tejidos. Muestras tumorales embebidas en parafina obtenidas de nefrectomías o colonoscopías, fueron generosamente cedidas por el laboratorio de anatomía patológica del Instituto Alfredo Lanari (UBA). El uso de muestras de pacientes fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto y cuenta con el consentimiento informado del paciente.

El tejido embebido en parafina se fraccionó con un micrótopo en secciones de 4-6µm de grosor y se montó en portaobjetos cargados. Para detectar la positividad y localización de RAC3 se utilizó el sistema Avidina – Estreptavidina - Peroxidasa.

Para realizar el ensayo se desparafinó e hidrató gradualmente el corte mediante el pasaje por soluciones de xilol, alcohol 100%, alcohol 70% y agua. Luego, con el objetivo de desenmascarar el antígeno se realizó tratamiento a 95°C en *buffer* de citrato de sodio 10mM (PH 6), completando con *buffer* fresco 5 minutos y se dejó enfriar en el mismo 25 minutos. Se lavó dos veces con PBS (pH 7) y se bloqueó la actividad peroxidasa interna mediante pasajes por metanol 10% a metanol 30% H₂O₂, se lavó con PBS. Seguidamente se bloqueó para disminuir el pegado inespecífico incubando los cortes 1 hora con SFB (suero fetal bovino), se lavó con PBS e incubó toda la noche con el anticuerpo anti-RAC3 1/200 en PBS-BSA 1,5% a 4°C en cámara húmeda.

Al día siguiente se lavó tres veces con PBS e incubó con anticuerpo anti-conejo biotinilado 1/500 por 45 minutos. Se lavó 5 minutos con PBS e incubó con Avidina/Peroxidasa 1/250 por 15 minutos. Se lavó con PBS 10 minutos y se reveló

la reacción agregando el cromógeno 3.3'-Diaminobencidina (DAB) (*SIGMA*) más 15ul de H₂O₂, se observó el desarrollo de la reacción y se frenó con agua corriente. Para evidenciar las células y localizaciones en los cortes se tiñó con hematoxilina por 3 minutos y se lavó con agua corriente. Finalmente se procedió a deshidratar con los pasos inversos a la hidratación y se montó con un cubre objeto con bálsamo de Canadá.

Se observaron las muestras bajo microscopio óptico, La positividad se vio en color marrón y como control o testigo de la reacción se utilizaron cortes de páncreas cuya expresión proteica fue publicada por otros autores.

IV. vi. INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA (CHIP)

Se realizó la inmunoprecipitación de la cromatina ^[366] con el objetivo de evaluar si el factor de transcripción NF-κB se une a su etiqueta blanco hallada bioinformáticamente en el promotor de RAC3 clonado.

a. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

En estos experimentos se estimularon células HEK293 con TNF 10ng/ml en presencia o no de Sulfazalacina (SZ) 1mM. El inhibidor específico de la IKK, SZ se agregó 30 minutos previos al estímulo. Luego de 45 minutos se fijaron las células con Formaldehído 1% por 10 minutos (para fijar las proteínas unidas al ADN), se lavó la monocapa 2 veces con PBS y se levantó la monocapa con rastrillo trasvasándola a un microtubo. Los microtubos se centrifugaron a 3000rpm durante 5 minutos y el precipitado se resuspendió en 1ml de *buffer* Ripa modificado.

Seguidamente el precipitado resuspendido se sonicó por ultrasonido (*Sonifier 150, Branson*) con el objetivo de obtener fragmentos de ADN entre 500-1000pb con una frecuencia de 6 pulsos de 1 minuto a 40% de potencia. Se midió la concentración de ADN de partida.

Luego se separó una alícuota de 50μl para procesarla como input y se llevó a un volumen final de 500μl con *buffer* Ripa modificado, a lo que se agregó 5μl de Proteinasa K (20mg/ml) y se incubó 4-5 horas en agitación a 65°C.

Luego se extrajo el ADN con un volumen de Fenol 25: Cloroformo 24: isoamílico 1 (PIC 25:24:1). La fase acuosa se pasó a otro microtubo y se agregaron 2 volúmenes de Etanol 100% más 150µl de Acetato de sodio 3M y se precipitó en frío. El ADN precipitado se lavó para eliminar sales con 1ml de Etanol 70% y se centrifugó 10 minutos a 10000rpm. El precipitado de ADN finalmente se resuspendió en 50µl *buffer* TE y se cuantificó.

El resto de las muestras se procesaron como sigue:

b. REACCIÓN DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA

Se tomaron 25µg de ADN y se ajustó el volumen de reacción a 1ml con *buffer* Ripa modificado, luego se agregó 1 µl de anticuerpo primario anti-RelA y se incubó 18 horas en agitador orbital a 4°C, luego se agregaron 10µl de Proteína G-Sepharose (GE) y se incubó en agitación a 4°C durante 90 minutos. Se lavó tres veces con *buffer* de lavado y por una vez más con *buffer* final de lavado.

Finalmente el precipitado [(proteína G- anticuerpo primario) - complejo ADN-proteínas], se resuspendió en 450µl de *buffer* de elusión y se agitó 15 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 2 minutos a 10000rpm y el sobrenadante se trasvasó a un tubo al que se le agregó 5µl de Proteinasa K (20mg/ml), y se incubó a 65°C durante 4-5 horas con agitación. Luego se hizo una extracción con PIC y se precipitó el ADN de la fase acuosa. Se dejó evaporar y resuspendió en 25µl de *buffer* TE.

El enriquecimiento relativo del molde luego de la inmunoprecipitación respecto del *input* fue determinado mediante RT-qPCR con los *primers* 5'-TCCACAAATGTTAGGTATTACTGG-3' y 5'-GGGAGCTCCCTCGGGATCCG-3' que corresponden a etiquetas blanco de κB ubicadas a -199pb del primer exón del gen de RAC3. La señal específica fue calculada como la diferencia entre la media obtenida con los anticuerpos específicos y se normalizó con los valores de *input*. Los resultados se expresan en cantidad de veces de incremento relativo respecto de los valores del *input*.

BUFFER RIPA MODIFICADO

10mM	Tris-HCl (pH 8.0)
65mM	NaCl
1%	Tritón X-100
0,1%	SDS
5%	Deoxicolato

BUFFER DE LAVADO

20mM	Tris-HCl (pH 8.0)
150mM	NaCl
2mM	EDTA
1%	Tritón X-100
0,1%	SDS

BUFFER FINAL DE LAVADO

20mM	Tris-HCl (pH 8.0)
500mM	NaCl
2mM	EDTA
1%	Tritón X-100
0,1%	SDS

BUFFER DE ELUSIÓN

100mM	NaHCO ₃
1%	SDS

BUFFER TE	
250mM	Tris-HCl (pH 8.0)
5mM	EDTA

IV. v. ANTICUERPOS UTILIZADOS

Para los ensayos de *western blot*, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, e inmunoprecipitaciones se utilizaron los siguientes anticuerpos:

Anticuerpo	Proveedor	PM (kDa)
RAC3	<i>Santa Cruz</i>	160
	<i>Cell signalling</i>	
RelA	<i>Santa Cruz</i>	65
AKT1(B1)	<i>Santa Cruz</i>	60
p-AKT (Ser473)-R	<i>Santa Cruz</i>	60
P38	<i>Santa Cruz</i>	43
pP38	<i>Cell Signalling</i>	43
Tubulina	<i>Oncogen</i>	57
	<i>Santa Cruz</i>	
LC3 I	<i>Cell signalling</i>	18
LC3 II	<i>Cell signalling</i>	16
p62		62
Secundarios para IF		
FITC	<i>Vector</i>	
Secundarios para IH		
Biotinilado	<i>Jackson</i>	
Avidina-Peroxidasa	SIGMA	
DAB (di-amino bencidina)	SIGMA	

Tabla 7. Principales anticuerpos específicos utilizados en este trabajo de tesis.

V. PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS EMPLEADOS *IN VIVO*

V. i. MANTENIMIENTO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO

En la presente tesis todos los experimentos y protocolos utilizados con animales se realizaron en concordancia con la guía de cuidado y uso de animales de laboratorio publicada por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos.

El modelo animal se realizó con el fin de evaluar los efectos de la respuesta inflamatoria sobre la expresión de RAC3 (ver Resultados)

Ratones machos BALB/c de 6-8 semanas, con un peso promedio de 25-30 gramos se obtuvieron (con su certificado de salud correspondiente) del bioterio de la Facultad de Ciencias exactas y Naturales, Universidad Nacional de Buenos Aires. Los ratones se mantuvieron en condiciones óptimas de temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), humedad relativa ($55 \pm 10\%$) y ciclos controlados de 12 horas luz-oscuridad. Se alimentaron con una dieta estándar para roedores y agua administrada *ad limitum* por el lapso de siete a diez días previos al ensayo en el bioterio del Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Universidad de Buenos Aires – CONICET.

V. ii. MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO*

Se contó con 40 ratones, que además fueron separados en dos tandas de 20 ratones donde fueron divididos azarosamente en cuatro grupos de acuerdo al tratamiento recibido. Los tratamientos se realizaron en un volumen final de 200ul y se aplicaron intraperitonealmente (i.p.).

Los grupos fueron: control (solución fisiológica), lipopolisacarido bacteriano (LPS) en dosis sub-letales 2mg/kg (L4130, *Escherichia Coli* 0111:B4, Sigma), Dexametasona 6mg/kg (DEX-Sigma) y LPS más Dex que se inyectó media hora antes a la administración de LPS. Los ratones fueron sacrificados luego de 6 y 24

horas después del tratamiento con LPS. Para la anestesia y analgesia quirúrgica se utilizó Ketamina 90mg/kg /xilazina 10mg/kg.

En el tiempo de 6 horas post-tratamiento con LPS el sacrificio se produjo por punción cardíaca, donde se extrajo sangre para futuras mediciones. Por otro lado en el tiempo de 24 horas post-administración de LPS y con el objetivo de eliminar cualquier tipo de interferencia que la sangre dado su elevada expresión de RAC3 pueda tener en las mediciones del mismo en otros órganos, se realizó la perfusión intracardiaca con solución fisiológica 10% heparina a un flujo de 1ml/min obtenido con bomba peristáltica (LKB 2232, *MicroPerpex S*).

V. iii. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE ARN TOTAL Y PROTEÍNAS

La homogenización del bazo se realizó con un homogenizador manual ya sea para preparar extractos proteicos o de ARN total

Por otro lado, el bazo extirpado quirúrgicamente se fraccionó en secciones de aproximadamente 30mg y se colocó en distintos microtubos a uno de ellos se le agregó TRIzol y se homogenizó inmediatamente, para extracción de ARN total, a otro se agregó 1ml de *buffer* de lisis y se homogenizó para realizar extracto proteico, el resto de los cortes se almacenaron a -80°C para posterior estudios.

RESULTADOS

*“Si luchamos podemos perder,
si no luchamos estamos perdidos”*

I. LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE RAC3 SON REGULADOS POSITIVAMENTE EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA

I. i. LA RESPUESTA INFLAMATORIA AUMENTA LOS NIVELES DEL GEN DE RAC3 EN BAZO

En trabajos previos ya publicados por nuestro laboratorio se demostró que RAC3 es coactivador de NF- κ B^[46], factor de transcripción clave inducido en la respuesta inflamatoria. Por otro lado, trabajos recientes demuestran que RAC3 es un importante mediador en la respuesta inflamatoria y el shock séptico^[127, 128, 367]. Por lo tanto, se quiso determinar si la misma respuesta inflamatoria podía modificar la expresión de RAC3. Para ello se recurrió a un modelo *in vivo* induciendo una respuesta inflamatoria mediante la administración i.p. de LPS en dosis subletales como se describe en la sección “Materiales y Métodos”.

La inducción efectiva de la respuesta inflamatoria se determinó a las 6 horas post-administración de LPS mediante RT-qPCR con *primers* específicos contra las principales citoquinas inflamatorias cuya producción es sabido se activa tempranamente en el bazo: TNF, IL-6, IL-1 β ^[368]. Del mismo modo se comprobó que fuese significativamente inhibida ante la administración i.p. previa del anti-inflamatorio Dex. Como se puede ver en la Figura 22 la dosis de LPS utilizada fue efectiva en inducir la respuesta inflamatoria y la administración previa de Dex inhibió de modo significativo la inducción en la expresión de las citoquinas determinada por RT-qPCR^[369].

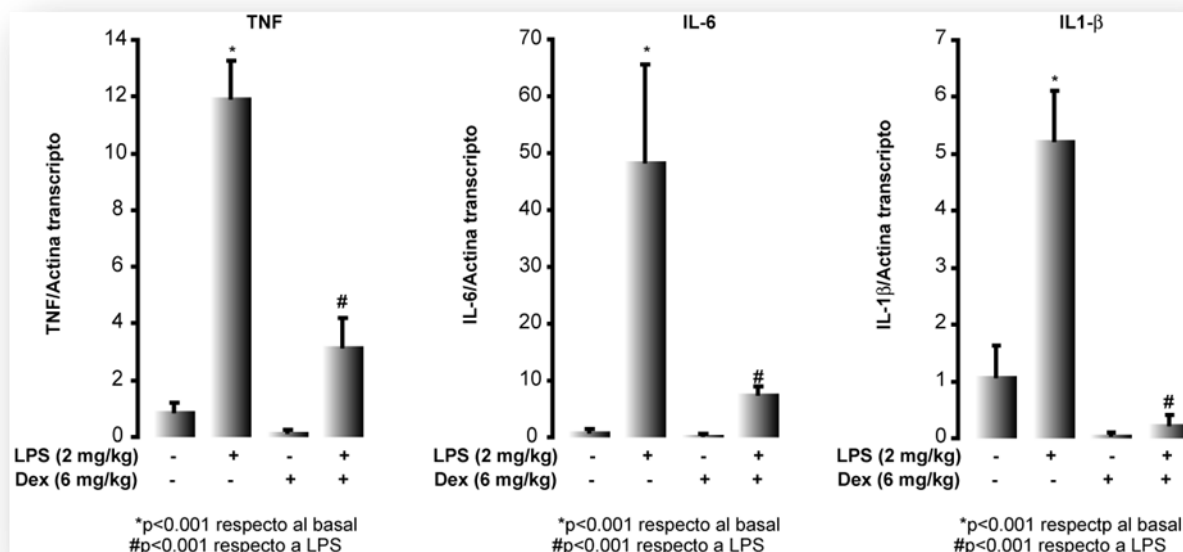


Figura 22. La dosis de LPS utilizada induce la respuesta inflamatoria. Niveles de ARNm de las citoquinas TNF, IL-1 β , IL-6 medidas por RT-qPCR y normalizados contra el ARNm de expresión constitutiva Actina. Las barras corresponden al promedio \pm DS de cinco animales y se muestran como la relación Citoquina/Actina respecto de la condición control analizados por el test de Tukey's.

Para evaluar el posible cambio en los niveles de expresión de RAC3 en la respuesta inflamatoria se analizaron los niveles de ARNm para esta molécula en extractos de bazo a las 24 horas post-administración de LPS por RT-qPCR utilizando *primers* específicos. Como muestra la Figura 23, los ratones a los que se administró LPS mostraron un incremento significativo en los niveles de expresión de RAC3 en comparación a los controles y este efecto fue antagonizado por la administración previa de Dex.

Por lo tanto, estos resultados sugieren que el aumento en la expresión de RAC3 ante la administración de LPS, si bien podrían deberse a un efecto directo del LPS, también podría estar mediado por las citoquinas inflamatorias inducidas en la respuesta inflamatoria, cuya síntesis y acción biológica es antagonizada por Dex, como es sabido [317, 370].

Por otra parte, cuando se analizaron los niveles de expresión de RAC3 en respuesta a Dex como único estímulo, para nuestra sorpresa, se obtuvo un efecto similar y aún más elevado en comparación a la administración de LPS. Este último resultado no era el esperado ya que existen numerosos antecedentes en la bibliografía que demuestran el antagonismo mutuo entre las vías activadas por citoquinas inflamatorias y Dex (precisamente, un anti-inflamatorio), incluyendo los mecanismos moleculares por los cuales esto ocurre ^[170, 371-374] ya mencionados en la “Introducción”. Por lo tanto, era esperado encontrar una ausencia de efecto de Dex o incluso de tendencia menor que los controles cuando se utilizaba como único estímulo consecuencia de la inhibición de los niveles y acción biológica basal de las citoquinas.

Los resultados obtenidos demuestran que Dex, a pesar de su acción anti-inflamatoria, tiene una acción biológica *per se*, directa o indirecta, estimuladora en el aumento de expresión de RAC3 *in vivo* como se puede ver en la Figura 23.

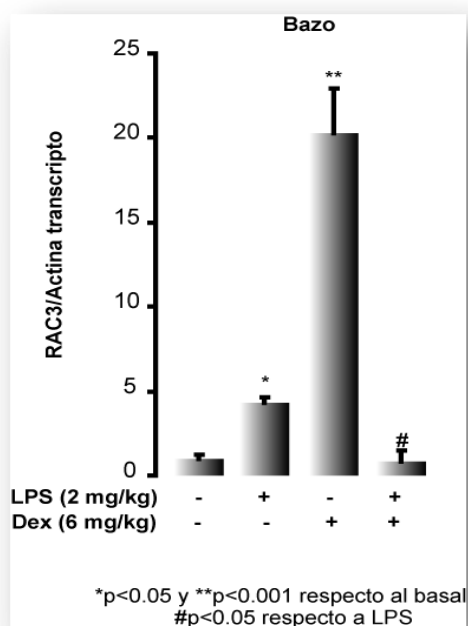


Figura 23. Señales pro- y anti-inflamatorias regulan la expresión de RAC3 en bazo. RT-qPCR a las 24hs post administración de LPS, Dex o ambos. Las barras muestran la relación de la expresión de RAC3 normalizada contra Actina y respecto a la condición control +/- DS, analizados con el test de Tukey's.

Como la respuesta inflamatoria es un fenómeno fisiológico generalizado que involucra la activación/inactivación de multiplicidad de vías, dentro de las que se encuentran las activadas por citoquinas y sus cascadas de señales, se quiso evaluar *in vitro* si una de estas citoquinas, como TNF podría regular la expresión de RAC3.

I. ii. LA CITOQUINA INFLAMATORIA TNF AUMENTA LA EXPRESIÓN DEL GEN DE RAC3

Dado que la expresión de RAC3 es aumentada en la respuesta inflamatoria y siendo TNF uno de los principales mediadores de los efectos más nocivos de la misma, como es el shock séptico, sumado a los antecedentes ya publicados por nuestro grupo en que se demuestra el rol estimulador de la citoquina vinculado a RAC3 en la proliferación de células de tumor de mama humano (ver Introducción), se realizaron experimentos *in vitro* con el fin de evaluar si TNF en forma directa puede regular los niveles de expresión de RAC3. En estos experimentos se utilizó la línea celular no tumoral HEK293 que posee receptores para TNF y glucocorticoides (CGs), además de niveles limitantes del coactivador y su flia., como es de esperar en células no tumorales.

Los resultados obtenidos al estimular con TNF 10ng/ml por 24 horas fueron un aumento significativo en los niveles de RAC3 tanto a nivel de su ARN mensajero (Figura 24) cuantificado por RT-qPCR, como proteicos (Figura 25) determinados por *western blot*. Estos resultados demuestran que el incremento en los niveles de RAC3 observado *in vivo* al administrar LPS es probablemente mediado por citoquinas, donde al menos TNF está involucrada.

Por otra parte, si bien es sabido que Dex es capaz de antagonizar algunas de las acciones biológicas de TNF, principalmente aquellas dependientes de NF- κ B (ver Introducción), nuestras observaciones *in vivo* sugieren que Dex, más allá de su acción anti-inflamatoria tiene un rol estimulador en la expresión de RAC3.

Con el fin de analizar si el efecto inducido por Dex administrada *in vivo* aumentando los niveles de RAC3 se reproducía en experimentos *in vitro*, células HEK293 se estimularon por 24 horas con Dex 500nM. La efectividad de la dosis utilizada en este modelo se confirmó determinando la activación del receptor de glucocorticoides (GR), mediante ensayos reporteros (ver Materiales y Métodos) utilizando el plásmido GRE-Luc (Figura 26).

Como se puede observar en las Figuras 24 y 25 y en concordancia con los resultados obtenidos *in vivo*, Dex aumentó significativamente los niveles de expresión de RAC3, tanto a nivel transcripcional (Figura 24) como proteico (Figura 25).

Resulta interesante destacar lo observado bajo el estímulo simultáneo con TNF y Dex, ya que como muestran las Figuras 24 y 25, Dex fue incapaz de inhibir la acción estimuladora de TNF a pesar del conocido antagonismo entre el GR activado y NF- κ B ^[169, 375]. Más aún, el efecto del tratamiento simultáneo con ambos estímulos resultó similar al estímulo con TNF solamente. Estos resultados podrían sugerir que la acción más importante de Dex *in vivo* sobre los efectos de la respuesta inflamatoria en la regulación de la expresión de RAC3 se pueden deber fundamentalmente a una inhibición de la síntesis de citoquinas más que a la inhibición de su actividad biológica, al menos, para TNF. Claramente *in vitro*, prevalece la acción estimuladora de TNF y Dex por sobre el antagonismo entre NF- κ B y GR activado.

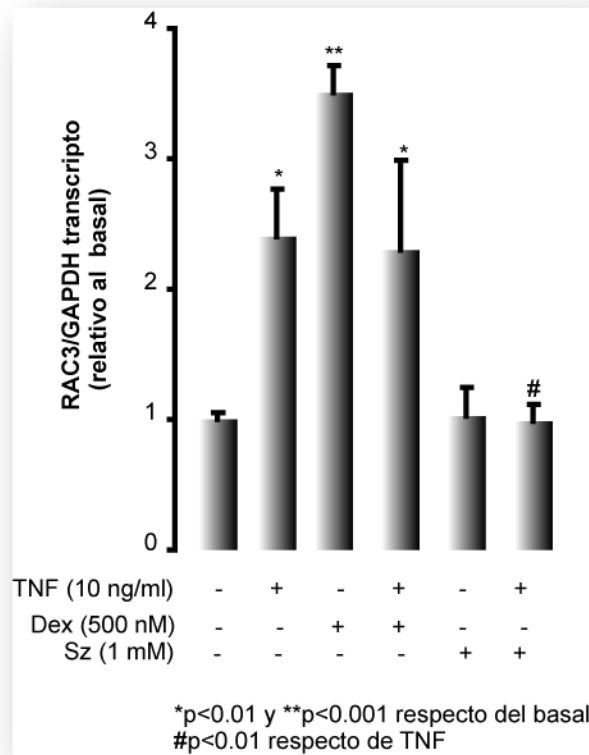


Figura 24. TNF regula positivamente los niveles de ARNm RAC3. Expresión del ARN mensajero de RAC3 determinada por RT-qPCR en células HEK293 estimuladas por 24 horas con TNF 10ng/ml, Dex 500nM, TNF más Dex o TNF en presencia del inhibidor específico SZ 1mM. El diagrama de barras corresponde al promedio obtenido de RAC3 normalizado con GAPDH +/- el DS y relativizado con la condición control, analizados con el Test de Tukey's.

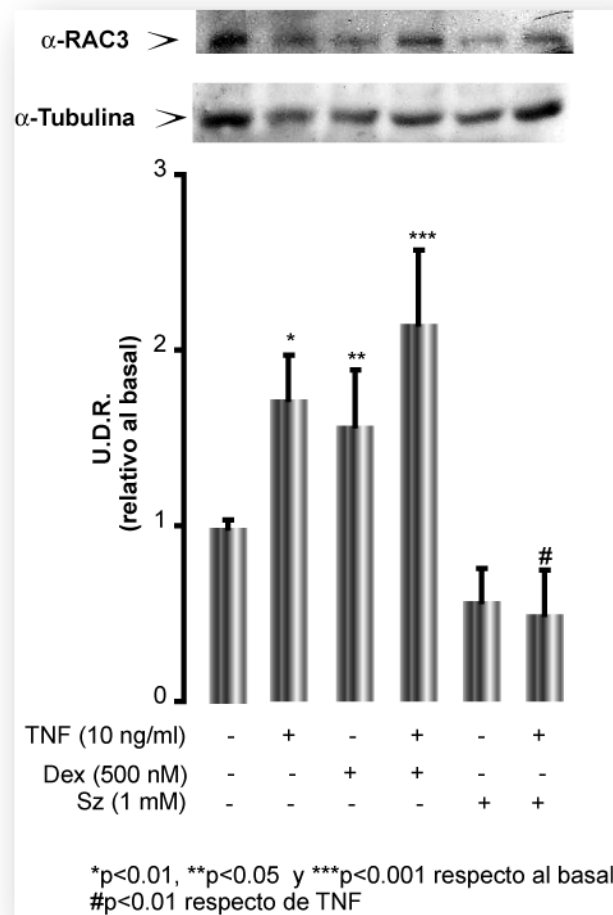


Figura 25. TNF y Dex aumentan los niveles de RAC3 a nivel proteico en células HEK293.

Western Blot contra RAC3 en células HEK293 estimuladas por 24 horas con TNF 10ng/ml, Dex 500nM, TNF más Dex o TNF en presencia de SZ 1mM relativizados con la proteína de expresión constitutiva Tubulina. Las barras indican unidades densitométricas relativas (U.D.R.) obtenidas con el programa *ImageJ* del promedio de tres experimentos independientes \pm DS, analizados con el Test de Tukey's.

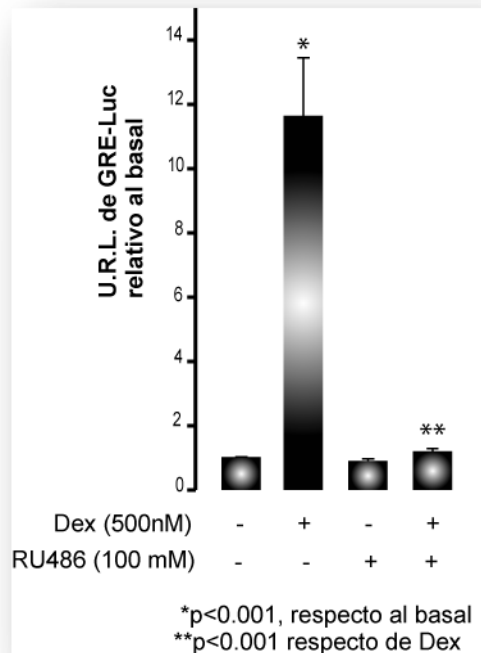


Figura 26. El estímulo con Dex 500nM aumenta la actividad GRE-Luc. Ensayos reporteros en células HEK293 transfectadas transientemente con una construcción conteniendo el gen de Luciferasa bajo el control de un promotor con etiquetas de pegado específico para el receptor de glucocorticoides (GRE) y estimuladas por 24hs. con Dex 500nM, su inhibidor específico RU486 100nM o ambos. El diagrama de barras muestra U.R.L: unidades relativas de luz +/- DS, analizados por el test de Tukey's.

Como una de las principales vías que activa la citoquina TNF es la de NF- κ B, se decidió investigar si el aumento de RAC3 obtenido al estimular con TNF se debía al menos a la activación de esta vía.

I. iii. EL AUMENTO EN LA EXPRESIÓN DE RAC3 POR LA CITOQUINA TNF INVOLUCRA LA VÍA DE NF- κ B

Dado que una de las posibles vías por las cuales TNF podría estar regulando la expresión de RAC3 es a través de la activación de NF- κ B, se realizaron experimentos *in vitro* con el objeto de evaluar si el bloqueo específico de este factor impedía el aumento en la expresión de RAC3 al estimular con TNF.

Para ello y con el fin de confirmar que la dosis de TNF utilizada efectivamente activa a NF- κ B, primero se realizaron ensayos reporteros utilizando un plásmido que tiene etiquetas blanco de NF- κ B controlando la expresión del gen de la Luciferasa, y que además puede ser inhibido por el agregado del inhibidor farmacológico SZ en la dosis elegida (Figura 27).

Para determinar si la acción estimuladora de TNF sobre la expresión de RAC3 observada en los experimentos de RT-qPCR y *western blot* podría ser mediada por la vía de NF- κ B, células HEK293 fueron estimuladas con TNF (10ng/ml) en presencia o ausencia de SZ (1mM) por 24 horas.

Observamos que el agregado del inhibidor farmacológico de la vía de NF- κ B inhibe el aumento en la expresión de RAC3 por TNF, tanto a nivel transcripcional como proteico como se muestra en las Figuras 24 y 25, lo cual sugiere que el aumento en la expresión de RAC3 por TNF involucra la activación de este factor de transcripción.

Resultados similares se obtuvieron ante el tratamiento con TNF en la línea tumoral de mama T47D, con elevados niveles proteicos de RAC3 endógeno (ver Materiales y Métodos) como se ve en la Figura 28.

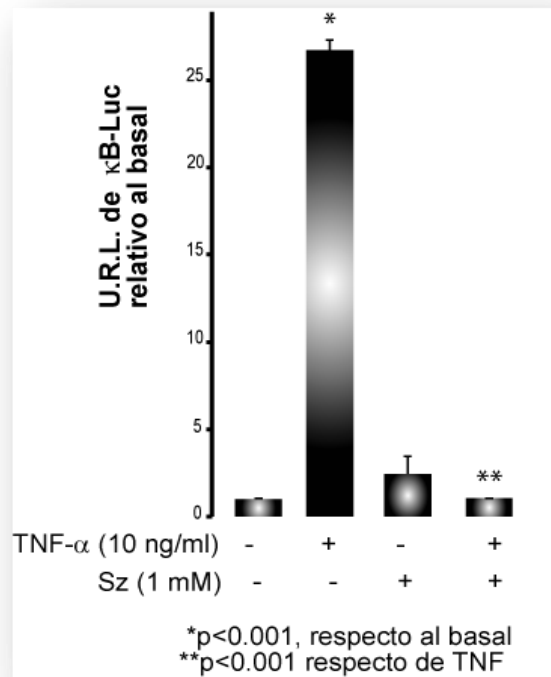


Figura 27. La dosis de Sulfazalacina utilizada inhibe la actividad de NF- κ B inducida por TNF.

Ensayos reporteros con el plásmido κ B-Luc controlando la expresión del gen de la Luciferasa. El diagrama de barras muestra en unidades relativas de luz (U.R.L.) \pm DS, analizados por el test de Tukey's.

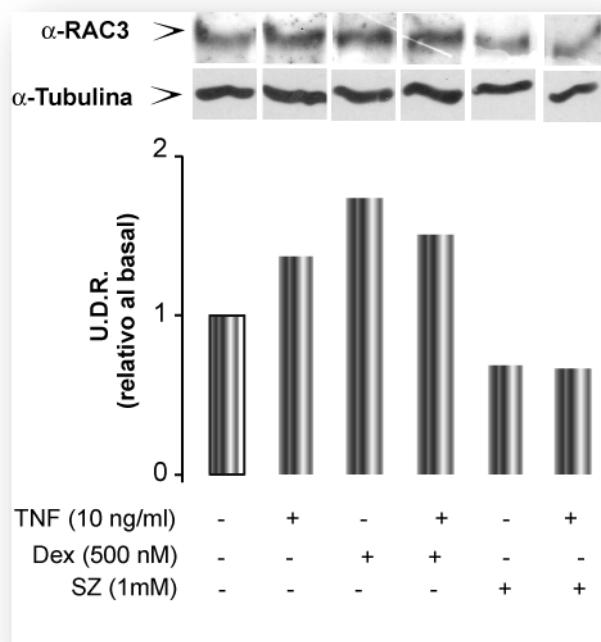


Figura 28. TNF y Dex inducen el aumento en la expresión del gen de RAC3 en células T47D.

Western blot contra RAC3 en células T47D con altos niveles de RAC3 endógenos relativizados con la proteína de expresión constitutiva Tubulina. Las barras indican unidades densitométricas relativas (U.D.R.) obtenidas con el programa *ImageJ*

Habiendo demostrado que la vía de NF- κ B participa en la regulación de la expresión de RAC3 por TNF, se quiso evaluar qué otras vías activadas por TNF pueden participar en su acción.

I. iv. LA VÍA DE P38 PARTICIPA EN LA REGULACIÓN DE RAC3 POR LA CITOQUINA TNF

La activación de la vía de transducción de señales de la kinasa p38, es clave en la regulación de muchos procesos celulares, incluyendo la respuesta inflamatoria, activada entre otros por citoquinas; mediando la transducción de señales en el núcleo y activando genes de respuesta que involucran también a NF- κ B^[376, 377]. Resultados

ya publicados de nuestro laboratorio demostraron la disminución de la actividad de NF- κ B al bloquear la vía de p38 con el inhibidor específico SB ^[378] mediante ensayos reporteros.

De acuerdo con estos antecedentes, se quiso determinar si la activación de esta MAPK estaba involucrada en la regulación de la expresión de RAC3 mediada por TNF. Para esto, se realizaron experimentos en células HEK293 que fueron estimuladas con TNF 10ng/ml, en presencia o no del inhibidor específico de la vía de p38, SB202190 (SB).

En la Figura 29 se muestra la efectividad de la dosis de SB utilizada (20uM) mediante ensayo de *western blot* para activación de p38MAPK por TNF, mediante la relación de la kinasa activa (fosforilada) respecto de la kinasa total pP38/P38.

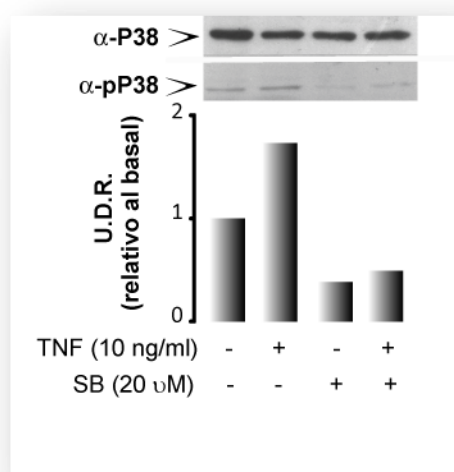


Figura 29. El inhibidor de la vía de p38 es efectivo en la dosis utilizada. *Western Blot* contra P38 y pP38, 60 minutos post-estímulo con TNF, en presencia o no del inhibidor específico de esta vía SB202190 en células HEK293. Las barras muestran unidades densitométricas relativas obtenidas con el programa *ImageJ* de la relación pP38/P38 y referida a su basal.

La Figura 30 muestra los resultados obtenidos en la expresión de RAC3 bajo estímulo con TNF en presencia del inhibidor de p38MAPK, SB. Nuestros resultados demuestran que la activación de esta kinasa está involucrada en el aumento de la expresión de RAC3 mediada por TNF.

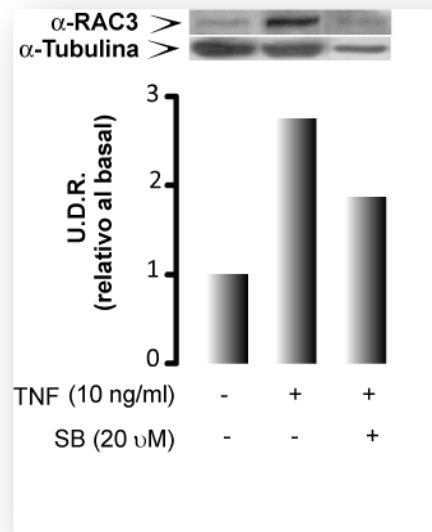


Figura 30. La vía de p38 participa en la regulación de RAC3 por TNF. *Western Blot* contra RAC3 a las 24 horas post-estimulo con TNF o con SB + TNF en células HEK293. El diagrama de barras muestra las unidades densitométricas relativas U.D.R. obtenidas con el programa *ImageJ*, de los niveles de RAC3 relativizados con la proteína de expresión constitutiva Tubulina.

De acuerdo con los resultados obtenidos, TNF es capaz de inducir el aumento en la expresión de RAC3 e involucra al menos la activación de NF- κ B y p38MAPK. Asimismo, el aumento en la expresión de RAC3 ocurre a nivel transcripcional y en algunos experimentos esto se correlaciona además, con un aumento en los niveles de proteína.

Dado que el aumento en los niveles de ARNm de RAC3 podría deberse tanto a un incremento de su vida media como a un aumento de la expresión génica por un efecto directo o no sobre su propio promotor, se decidió investigar las posibles secuencias blanco de factores de transcripción en el mismo.

I. v. EL FRAGMENTO DE 5kb RÍO ARRIBA DEL GEN DE RAC3 CONTIENE POSIBLES ETIQUETAS BLANCO DE UNIÓN A FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO TUMORAL

Como una primera aproximación a los factores que podrían regular la expresión de RAC3 a nivel de su propio promotor se realizó un análisis bioinformático en búsqueda de secuencias de pegado putativas para diferentes factores de transcripción. Para ello, se tomó la secuencia nucleotídica de 5000pb río arriba del gen de RAC3 humano (*ncoa3*) de [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9606&chr=20&query=uid\(752661,740115,12724734\)&QSTR=8202%5Bgene%5Fid%5D&maps=gene_set&cmd=focus](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9606&chr=20&query=uid(752661,740115,12724734)&QSTR=8202%5Bgene%5Fid%5D&maps=gene_set&cmd=focus) incluyendo al primer exón no traducido, ya que se sabe que los sitios regulatorios pueden estar lejos del sitio de inicio de la transcripción.

Luego, el fragmento fue analizado con los programas VECTOR NTI 10.0 (*Invitrogen*) y *on line* con MatInspector de *Genomatix* contra una base de datos con etiquetas blanco de unión para diferentes factores de transcripción humanos. Llamativamente, se hallaron múltiples sitios posibles de unión a factores implicados en tumorigénesis como al mismo NF- κ B, ER, HIF-1 α , PPAR, y AP-1 y otros en menor cantidad de sitios como FOXO, YY1, p53, etc., tal como se representó en la Figura 31.

Por otro lado, cabe destacar que la secuencia posee un alto porcentaje de nucleótidos C y G ^[379] y además se encontraron sitios de unión a la enzima ARN polimerasa I, posibles secuencias TATA box, cCAAT *enhancer* y otras que podrían corresponder a la zona promotora del gen de RAC3. Si bien vale aclarar que se han reportado promotores mínimos funcionales sin secuencias TATA tradicionales. En la Figura 31 también se muestran algunos de los sitios nombrados.

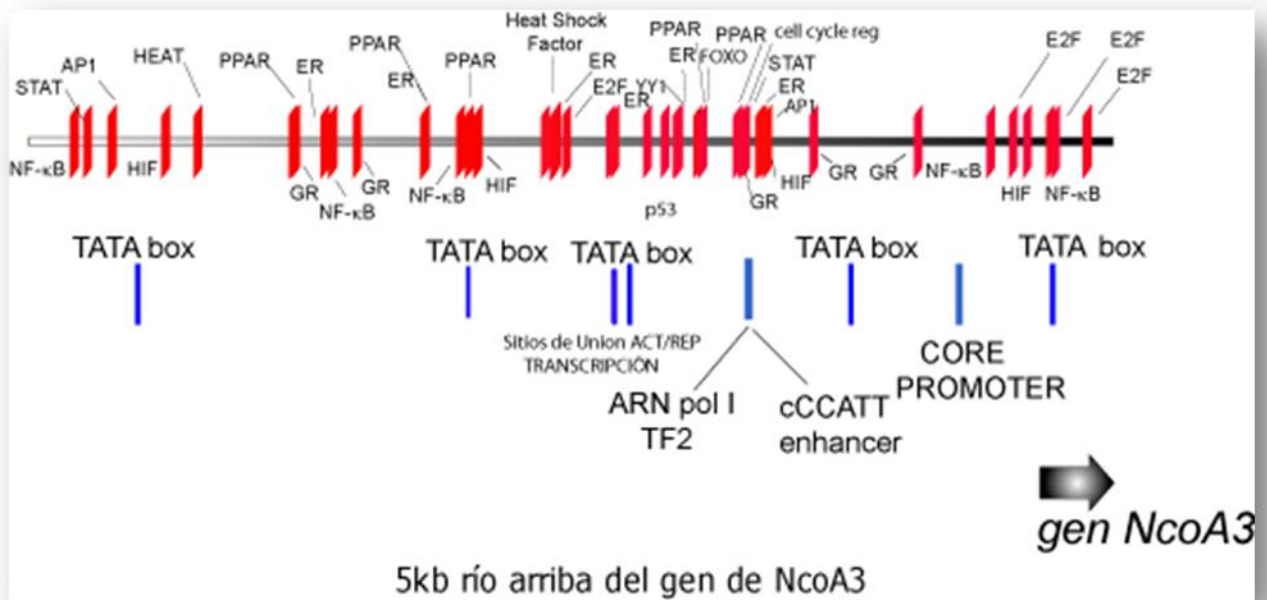


Figura 31. Análisis Bioinformático del promotor de RAC3 Sitios putativos de pegado para distintos factores de Transcripción y de elementos de reconocimiento de la maquinaria basal de la transcripción hallados bioinformáticamente.

El análisis bioinformático es de gran utilidad en una búsqueda pre-exploratoria y una herramienta más de investigación. Valiéndonos de la gran cantidad de genomas secuenciados quisimos buscar aquellas zonas que se encuentran conservadas evolutivamente entre especies emparentadas en la zona regulatoria del gen de RAC3.

I. vi. LAS ZONAS EVOLUTIVAMENTE CONSERVADAS EN LAS SECUENCIAS REGULATORIAS DEL GEN DE RAC3 CONTIENEN SITIOS DE UNIÓN A FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN INVOLUCRADOS EN TUMORIGÉNESIS

Como se ha evidenciado que secuencias conservadas evolutivamente en el ADN pueden resultar críticas para el control de la expresión génica ^[380], se realizó un alineamiento múltiple de una secuencia de 5kb río arriba del gen de RAC3

(incluyendo el primer EXÓN no traducido) contra seis especies de mamíferos relacionados (panda, rata, ratón, perro, vaca, zarigüeya). Para ello, se utilizó el programa *on line* ECR browser (<http://ecrbrowser.dcode.org/>). El criterio de selección fue “zonas con similitud igual o superior al 80%”.

Encontramos tres regiones altamente conservadas, que denominamos ECR1, ECR2 y ECR3. ECR1 de 189pb se encuentra en el mismo gen de +20 a +209pb, mientras que ECR2 de 136pb se ubicó de -142 a -6pb y ECR3 de 283pb de -4371 a -4088pb del sitio de inicio de la transcripción como se ve en la Figura 32. Cabe resaltar que las secuencias de ECR1 y ECR2 se encuentran conservadas entre todos los organismos analizados.

De acuerdo con estos resultados, las ECR's encontradas fueron examinadas con diferentes programas bioinformáticos en búsqueda de posibles sitios de unión a factores de transcripción, seleccionando aquellas con un *score* mayor a 0.75.

La búsqueda resultó muy interesante ya que identificamos etiquetas blanco para NF- κ B, E2F en ECR1, para E2F, Snail en ECR2 y para Shock Térmico, NF- κ B, YY1, FOXO en ECR3, entre otros. En la Figura 32 se muestran sitios de unión a factores de transcripción involucrados en las vías proliferativas, de ciclo celular y anti-apoptóticas frecuentemente desreguladas en cáncer. Se muestran con * los sitios obtenidos con el programa *ConSite*, con ^ por *genomatix*, y con + los resultados obtenidos con *Alibaba2.0*.

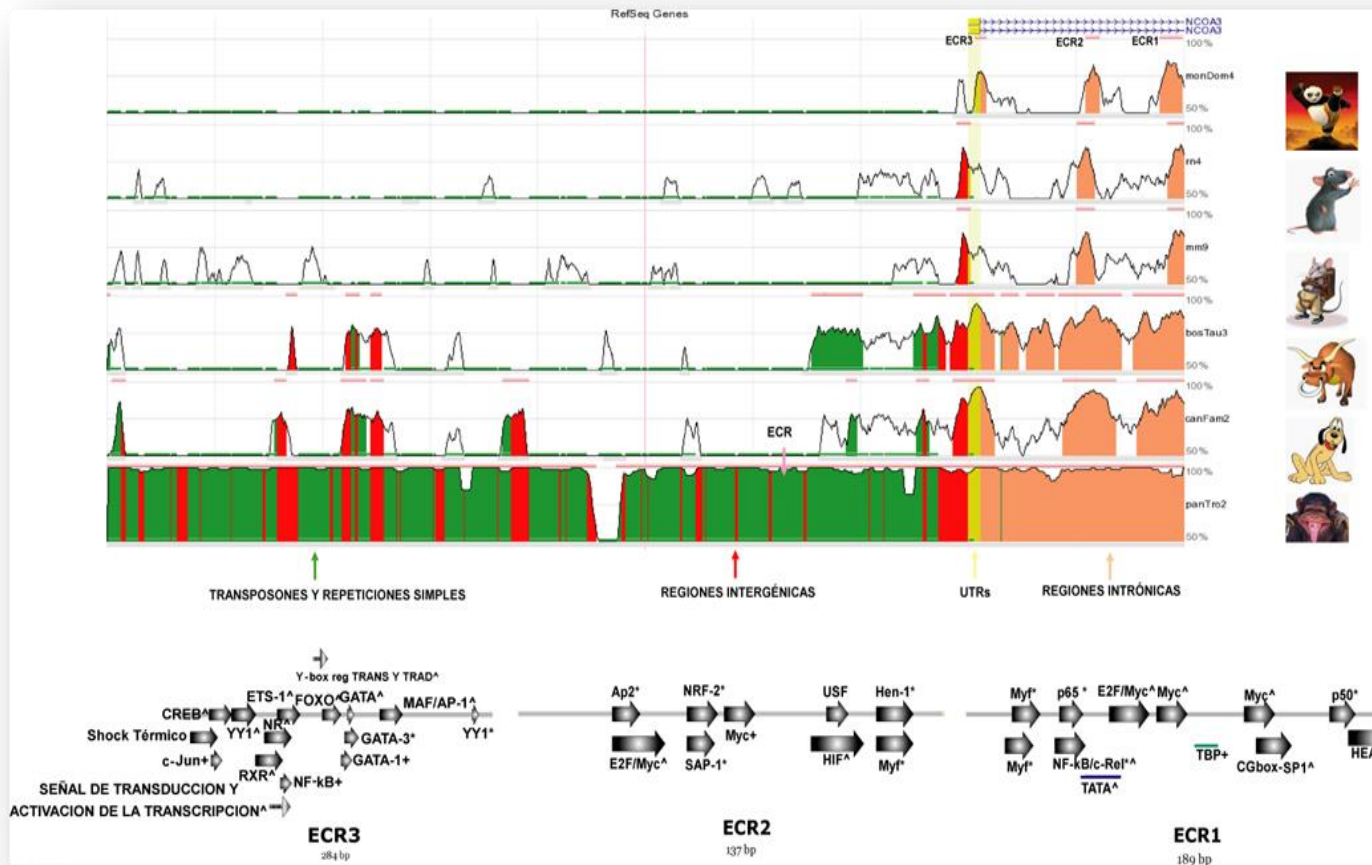


Figura 32. Zonas conservadas evolutivamente en el promotor de RAC3 entre especies relacionadas. En verde transposones y repeticiones simples; en rojo: regiones intergénicas, en amarillo: regiones no traducidas y en salmón: regiones intrónicas. En el panel inferior se analizan sitios de pegado para distintos factores de transcripción relacionados con tumores hallados bioinformáticamente para las tres zonas evolutivamente conservadas halladas.

De acuerdo con los resultados obtenidos en cuanto a la regulación de RAC3 por TNF, involucrando a la p38MAPK y la activación de NF-κB, sumado a la información brindada por el análisis bioinformático, se decidió profundizar en la participación de NF-κB en la regulación de RAC3.

I. vii. LA EXPRESIÓN DE RAC3 ES REGULADA POR EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF- κ B

Con el objetivo de evaluar si los sitios putativos de unión a NF- κ B hallados bioinformáticamente y además de los resultados obtenidos en la respuesta inflamatoria de la que justamente NF- κ B es un factor de transcripción clave ^[46] que puede ser activado por múltiples señales, como TNF, se quiso determinar primero si la sola activación de NF- κ B podía regular la expresión de RAC3.

Para evaluarlo se transfectaron células HEK293 (eficiencia de transfección >90%) con el vector de expresión de RelA (pRc-RelA), que es uno de los componentes con dominio de transactivación del dímero NF- κ B (ver Introducción), en presencia o no del vector de expresión de su represor I κ B β (pRc-I κ B β), o vector vacío (VV).

A modo de control, la efectividad de las masas plasmídicas utilizadas para estos experimentos fue analizada por ensayos reporteros utilizando el plásmido κ B-Luc. Como se muestra en la figura 33, la transfección con pRc-RelA induce el aumento de la actividad Luciferasa κ B dependiente, la cual resulta inhibida por co-transfección con pRc-I κ B β en la relación de masas utilizada.

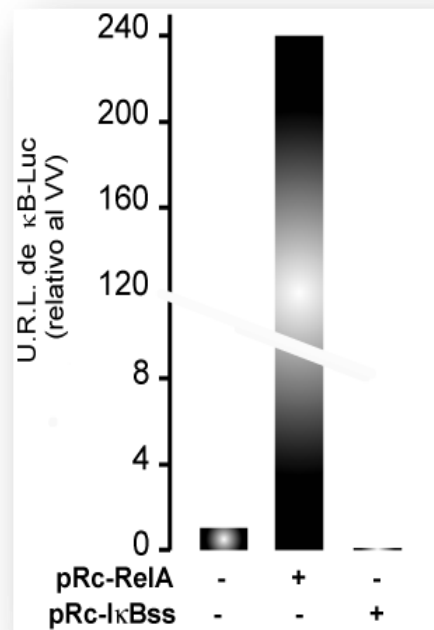


Figura 33. Control de transfección y actividad de los vectores de expresión sobre etiquetas de NF-κB. Ensayos reporteros donde se co-transfectó transientemente células HEK293 con un plásmido conteniendo el gen de la Luciferasa bajo el control de NF-κB, más vector vacío (VV), pRC-RelA o pRC-IκBss, en cada caso. Las barras expresan unidades relativas de luz (U.R.L.) de κb-luc.

Para investigar el rol de NF-κB en la regulación de la expresión de RAC3, se transfectaron células HEK293 con los vectores de expresión ya mencionados (RelA (pRc-RelA), IκBss (pRc-IκBss), ambos simultáneamente o vector vacío (VV)) y como se observa en la Figura 34, el aumento en los niveles de RelA, indujo el incremento en la expresión de RAC3 determinado por *western blot*. La figura muestra además la efectividad de la transfección en cuanto al aumento en los niveles de expresión de RelA. Como era predecible, la acción estimuladora de NF-κB fue bloqueada por el aumento en la expresión de su inhibidor específico IκBss.

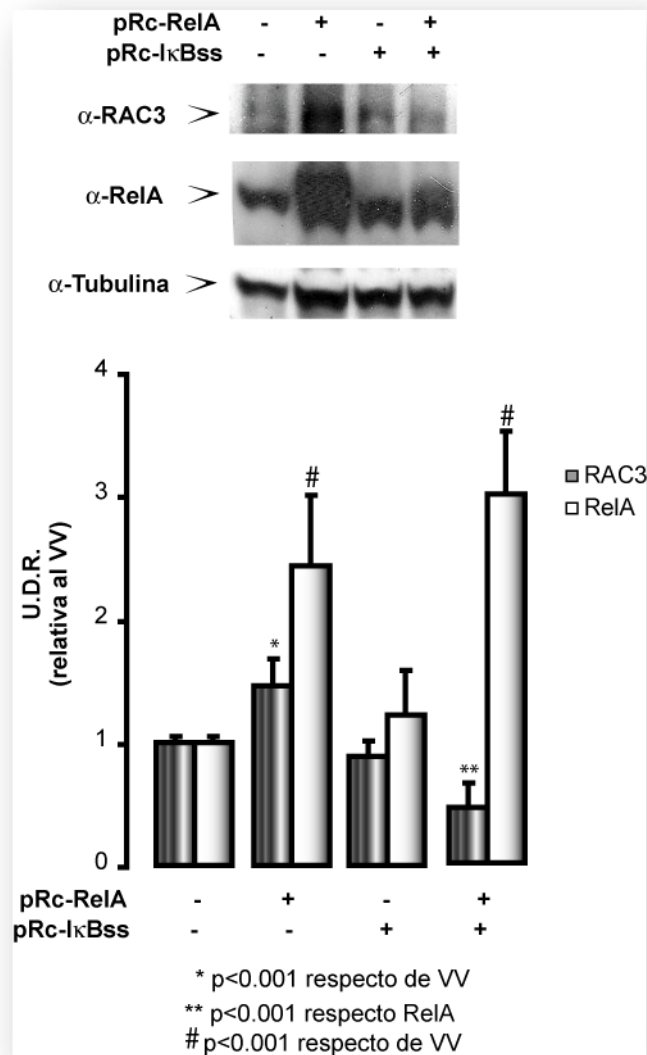


Figura 34. NF-κB aumenta la expresión de RAC3. *Western Blot* contra RAC3, RelA y Tubulina de células HEK293 transfectadas con el vector de expresión de RelA, IκBss, ambos simultáneamente o vector vacío por 24 horas. El diagrama de barras corresponde al promedio de tres experimentos independientes +/- DS de las unidades densitométricas relativas (U.D.R.) obtenidas con el programa *ImageJ* y analizadas con el test de Tukey's.

Resultados similares fueron obtenidos cuando se analizó los niveles de ARNm para RAC3 por RT-qPCR como se puede ver en la figura 35.

Estos resultados, conjuntamente con los obtenidos del análisis bioinformático sugieren entonces que una citoquina inflamatoria como TNF, a través de una cascada de señales que finalmente activa NF-κB podría estar regulando positivamente los

niveles de expresión de RAC3 a nivel transcripcional por una acción directa, a través de la unión a etiquetas blanco en el promotor de RAC3. Sin embargo, resultaba importante confirmar si estas etiquetas halladas resultaban funcionales.

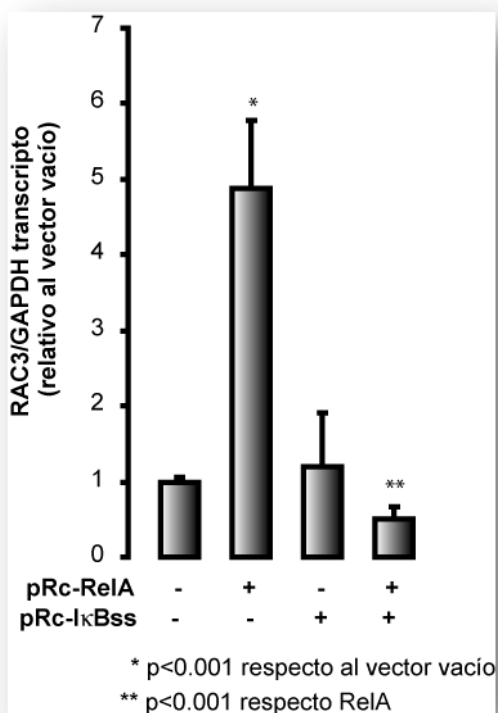


Figura 35. NF-κB aumenta los niveles de ARN mensajero de RAC3. RT-qPCR de células HEK293 transfectadas con el vector de expresión de RelA, IκBss, ambos o vector vacío por 24 horas. El diagrama de barras muestra el promedio por triplicado \pm DS del ARNm de hRAC3 normalizado con GAPDH y relativizado a la condición control analizados por el test de Tukey's.

I. viii. SEÑALES PRO- Y ANTI-INFLAMATORIAS ACTIVAN EL PROMOTOR DE RAC3

Con objeto de determinar si el aumento en los niveles de RAC3 observado al estimular células HEK293 con la citoquina se debía al menos a una acción directa sobre el promotor de RAC3, células HEK293 fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido reportero promRAC3-Luc construido en nuestro laboratorio ^[361] (ver

Materiales y métodos). El plásmido posee el gen de la Luciferasa bajo el control de un fragmento del promotor de RAC3 (-1970 a +335). Las células transfectadas fueron estimuladas con TNF, con Dex o ambos estímulos simultáneamente, por 24hs.

Como se observa en la Figura 36 tanto TNF como Dex aumentaron significativamente la expresión de Luciferasa bajo el control del promotor de RAC3, demostrando entonces una acción directa de ambas cascadas de señales a nivel transcripcional que lleva al aumento del ARNm de RAC3.

Por otro lado, se observa nuevamente la tendencia observada *in vitro* ante el tratamiento con ambos estímulos donde no se observa antagonismo mutuo entre Dex y TNF, reforzando la hipótesis de que el antagonismo obtenido *in vivo* podría deberse al complejo contexto fisiológico del organismo en una respuesta inflamatoria.

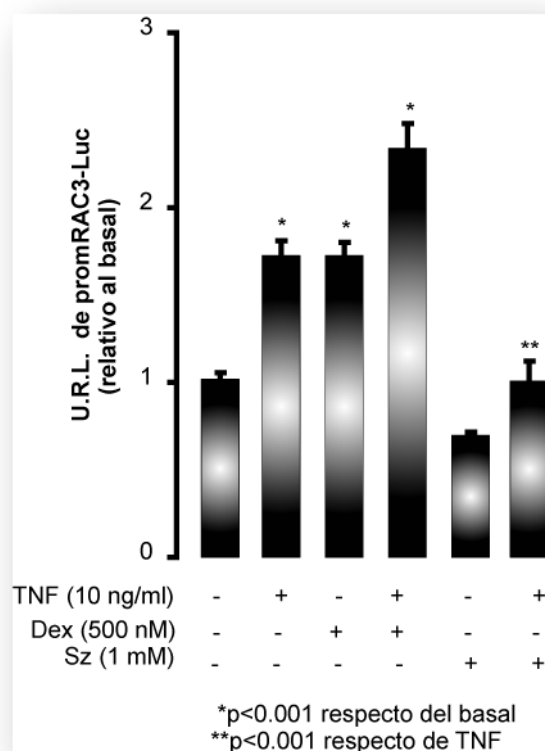


Figura 36. TNF y Dex activan el promotor de RAC3. TNF y Dex regulan positivamente la actividad Luciferasa sobre el promotor de RAC3 en células HEK293 transfectadas transientemente con el promRAC3-Luc y estimuladas con TNF (10ng/ml), Dex (500nM), Dex + TNF, SZ (1mM) o SZ + TNF por 24 horas. El diagrama muestra unidades relativas de luz (U.R.L.) normalizadas con actividad β -gal y analizadas por el test de Tukey's.

De acuerdo con los resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro* ambas señales pro- y anti-inflamatorias por si solas regulan la expresión de RAC3. El hecho de que ambas señales lo regulen indicaría que probablemente ambas vías utilizarían al coactivador. Si bien en trabajos ya publicados hemos demostrado que RAC3 coactiva a NF- κ B y GR ^[46] que justamente son factores claves de la respuesta pro- y anti-inflamatoria, resultó importante investigar ahora más allá de lo observado cuando éste se sobre-expresa, cuán significativa sería la depleción de RAC3 en estas vías en condiciones en que los otros integrantes de la familia se encuentren también en cantidades limitantes, como ocurre en condiciones no patológicas.

I. ix. RAC3 ES NECESARIO PARA LA RESPUESTA DE TRANSACTIVACIÓN DE GR y NF- κ B

Si bien se han descripto diversos coactivadores para GR y NF- κ B ^[381], dentro de los que se halla RAC3 ^[46] y dentro de la flia. de p160 a la que pertenece se ha demostrado que TIF2 es importante en la transrepresión de IRF3 mediada por GR ^[178]. Los resultados obtenidos en cuanto al aumento en los niveles de expresión de RAC3 ante el estímulo con Dex tanto *in vitro* como *in vivo*, sugieren la importancia que RAC3 puede tener en esta vía, es por ello que se quiso profundizar en cuán significativa es la expresión RAC3 en los mecanismos de transactivación de GR y NF- κ B en un modelo donde los niveles de toda la familia de p160 se encuentra en cantidades limitantes, como ocurre fisiológicamente y donde no se ha caracterizado aún. Para ello se utilizó la línea no tumoral HEK293 cuyos niveles de RAC3 y demás miembros de la familia son limitantes ^[228], tal como hemos descripto y que además poseen una eficiencia de transfección > al 90%.

Las células transfectadas con el vector de expresión para RAC3-RNAi ^[228, 284, 361] o control fueron estimuladas por 24hs con TNF 10ng/ml, Dex 500nM o ambos simultáneamente.

Como era de esperar bajo condiciones de expresión normales de RAC3, TNF induce la transcripción mediada por NF- κ B que es inhibida con Dex (Figura 37-A) y Dex aumenta la actividad Luciferasa controlada por elementos GRE [46] (Figura 37-B).

Sin embargo, en las células transfectadas con RAC3-RNAi la expresión de la Luciferasa fue significativamente inhibida a niveles basales bajo el control de sitios κ B al estimular con TNF, así como también la dependiente de GR bajo el control de sitios GRE al estimular con Dex, tal como se muestra magnificado en la Figura 38.

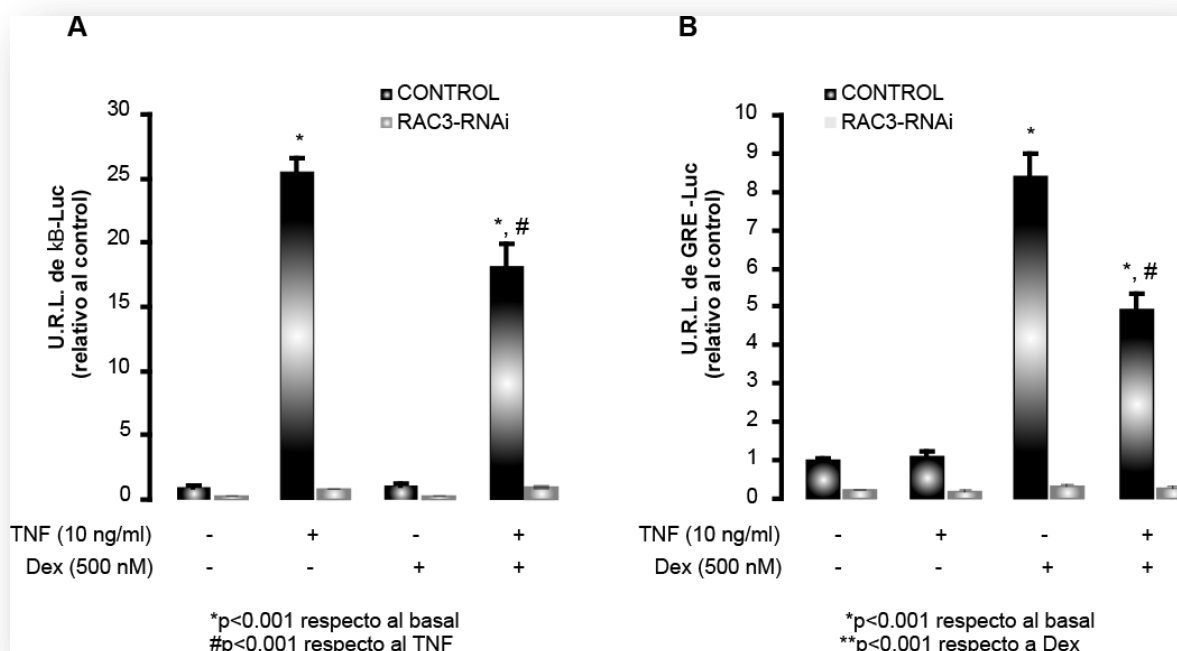


Figura 37. RAC3 es requerido para la transactivación de NF- κ B y de GR. Ensayos reporteros de células HEK293 transfectadas con RAC3-RNAi o control y co-transfectadas con los plásmidos (A) κ B-Luc o (B) GRE-Luc y estimuladas por 24hs. con TNF (10ng/ml), Dex (500nM) o ambos. El diagrama de barras corresponde al promedio de las unidades relativas de luz (U.R.L.) \pm DS analizados por el test de Tukey's.

Por otro lado, como se muestra en la Figura 38 tampoco se detectó el antagonismo mutuo entre GR y NF- κ B en ausencia de RAC3 en la expresión del gen de la Luciferasa regulada por sitios GRE o por elementos κ B, demostrando

que en células no tumorales con bajas cantidades de todos los coactivadores de la familia, la presencia de RAC3 es muy importante para ambos factores y su antagonismo mutuo, al menos en la regulación de la expresión de genes controlados por sus etiquetas blanco. De esta manera y en los tiempos ensayados la ausencia de RAC3 no logra ser compensada por la presencia de los otros miembros de la familia de p160.

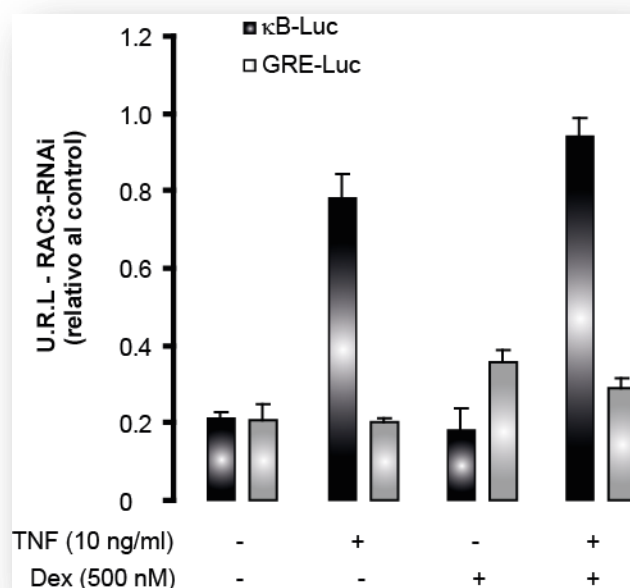


Figura 38. La expresión de RAC3 es requerida para la transactivación de NF-κB y de GR.

Ensayos reporteros de células HEK293 transfectadas con RAC3-RNAi y co-transfectadas con los plásmidos κB-Luc o GRE-Luc y estimuladas por 24hs. con TNF (10ng/ml), Dex (500nM) o ambos. El diagrama de barras muestra en una escala mayor las actividades κB-Luc y GRE-Luc en presencia de RAC3-RNAi correspondiente al diagrama de barras de la Figura 37.

Tal como demostramos la expresión de RAC3 se ve aumentada en la respuesta inflamatoria ante la administración de LPS *in vivo* y además *in vitro* ante el estímulo con TNF donde participa NF-κB, y también puede ser aumentada directamente por este factor de transcripción, es por ello que resulto importante investigar que ocurría a nivel del promotor de RAC3.

I. x. NF- κ B ACTÚA POSITIVAMENTE SOBRE EL PROMOTOR DE RAC3

Para evaluar la participación de NF- κ B sobre el promotor de RAC3, primeramente se realizaron ensayos reporteros en células HEK293 transfectadas transientemente con el plásmido promRAC3-Luc, más cantidades limitantes del vector β -gal y se estimuló por 24hs con TNF (10ng/ml) en presencia o ausencia del inhibidor específico de la IKK, SZ (1mM). Como se mostró en la Figura 36 el aumento en la actividad Luciferasa por TNF fue significativamente inhibido con SZ.

Si bien los resultados obtenidos sugieren fuertemente una acción directa de NF- κ B sobre el promotor de RAC3, se quiso confirmar si el mismo efecto obtenido con TNF vía NF- κ B sobre el promotor de RAC3 se reproducía utilizando el modelo de sobre-expresión de RelA (componente del dímero de NF- κ B) en ensayos reporteros en co-transfección con los vectores de expresión para RelA, I κ Bss o ambos en simultáneo. Como se puede observar en la Figura 39 la sobre-expresión de RelA aumentó la actividad del promotor de RAC3, y además este aumento fue significativamente inhibido al impedir la translocación de NF- κ B al núcleo con I κ Bss.

Estos resultados demuestran que NF- κ B tiene una acción directa sobre el promotor de RAC3 aumentando su actividad transcripcional y elevando los niveles de coactivador en una respuesta inflamatoria.

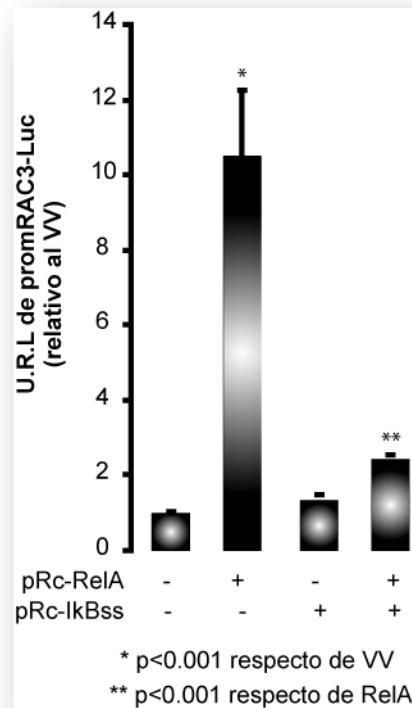


Figura 39. NF- κ B actúa positivamente sobre el promotor de RAC3. Ensayos reporteros en células HEK293 transfectadas con el promRAC3-Luc en co-transfección con RelA, I κ Bss, o ambos en ausencia de estímulo. Las barras indican unidades relativas de luz U.R.L. de actividad Luciferasa normalizadas con β -gal con respecto al VV, analizadas mediante el test de Tukey's.

De acuerdo con estos resultados y ante la presencia de sitios putativos de unión a NF- κ B en el promotor de RAC3 hallados bioinformáticamente, se quiso determinar si estas secuencias consenso eran funcionales y capaces de unir al factor de transcripción.

I. xi. **NF- κ B ACTIVADO POR EL ESTÍMULO CON TNF ES RECLUTADO A SU SECUENCIA BLANCO EN EL PROMOTOR DE RAC3**

Dado que el factor de transcripción NF- κ B podría ejercer su acción estimulatoria sobre el promotor de RAC3 directamente o indirectamente vía otra etiqueta/s, se

realizaron experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina (Chip) con el fin de determinar si efectivamente NF- κ B se unía a por lo menos una de sus etiquetas blanco hallada bioinformáticamente.

En estos experimentos se identificó la unión de RelA a la secuencia consenso de unión a NF- κ B en la ubicación -199pb río arriba del promotor de RAC3 y fue analizada por RT-qPCR utilizando *primers* específicos. Para ello se realizó la inmunoprecipitación con el anticuerpo contra la subunidad RelA (subunidad activa más abundante en dímeros NF- κ B) de células HEK293 estimuladas con TNF y siguiendo el protocolo que se detalla en Materiales y Métodos. Los fragmentos de ADN asociados fueron amplificados por RT-qPCR utilizando *primers* específicos.

Como se muestra en la Figura 40, el estímulo con TNF, induce la activación de NF- κ B y produce un aumento significativo en la unión de este factor a la secuencia consenso identificada en el promotor de RAC3, lo cual es inhibido específicamente por el inhibidor farmacológico de NF- κ B, SZ. De acuerdo con estos resultados se confirma que la secuencia identificada es funcional, capaz de unir al factor de transcripción en forma específica y podría ser al menos, una de las responsables de la acción estimulatoria del aumento en la expresión de RAC3 observado en la respuesta inflamatoria.

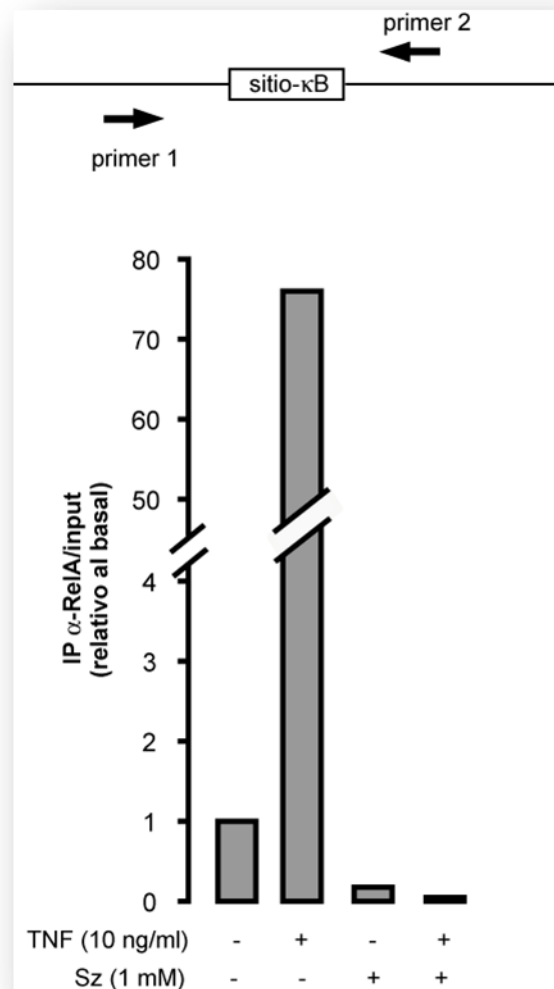


Figura 40. La etiqueta de NF-κB hallada bioinformáticamente en el promotor de RAC3 es funcional. Inmunoprecipitación de la cromatina en células HEK293 estimuladas con TNF (10ng/ml) por 45 minutos en presencia o no de SZ (1mM) inmunoprecipitadas con el anticuerpo específico de RelA. El diagrama de barras muestra el enriquecimiento relativo del molde post-inmunoprecipitación respecto del *input*.

II. LA VÍA mTOR ESTA INVOLUCRADA EN LA REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN y ACTIVIDAD DE RAC3

Como se mencionó en la Introducción la vía mTOR se encuentra frecuentemente desregulada en numerosos tipos tumorales ^[382] y en particular la vía mTORC1 es inhibida por Rapamicina y análogos. Por otra parte, mencionamos también trabajos publicados que demostraron que la sobre-expresión de RAC3 es responsable de la activación continua del receptor de IGF-1, lo que sugería la activación de la vía PI3K/AKT/mTOR en el fenotipo pre-maligno y el desarrollo tumoral en un modelo de ratón transgénico de RAC3 ^[229]. Es por ello que de acuerdo a los antecedentes mencionados, sumados al rol protector de la apoptosis de RAC3 ^[228, 284] resultó importante investigar si la inhibición de la vía mTOR podría modificar los niveles de expresión o la actividad de RAC3.

II. i. LA INHIBICIÓN DE LA VÍA mTOR DISMINUYE LOS NIVELES PROTEICOS DE RAC3

Actualmente RAC3 es considerado un oncogén y como se detalla en la Introducción, se encuentra frecuentemente sobre-expresado en muchos tumores, es por ello que RAC3 resulta un blanco muy atractivo en terapias antitumorales. Por esta razón y teniendo presente las propiedades antitumorales de la Rapamicina resultó interesante investigar qué efecto tendría inhibir la vía mTOR sobre los niveles de expresión de RAC3.

Para nuestra sorpresa, el tratamiento con Rapa 100nM por 24 horas disminuyó los niveles proteicos de RAC3 en distintas líneas tumorales que lo sobre-expresan, como se muestra en la Figura 41.

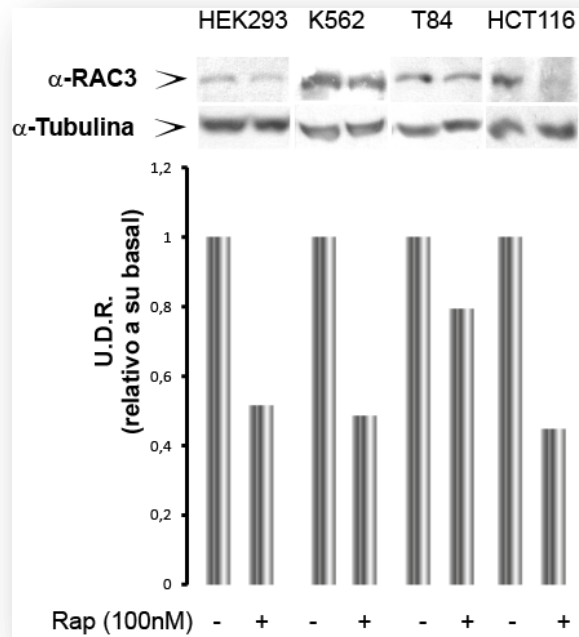


Figura 41. La inhibición de la vía mTOR disminuye los niveles proteicos de RAC3. *Western Blot* representativo contra RAC3 de tres experimentos independientes realizados en distintas líneas celulares estimuladas por 24 horas con Rapa 100nM y relativizados con la proteína de expresión constitutiva Tubulina. Las barras indican unidades densitométricas relativas (U.D.R.) obtenidas con el programa *ImageJ*.

Si bien uno de los mecanismos por los cuales se describió más robustamente los efectos río debajo de la vía mTOR en tumores es el traduccional, también se han descripto efectos en la regulación de genes a nivel transcripcional [383].

II. ii. LA RAPAMICINA INHIBE LA EXPRESIÓN DE RAC3 A NIVEL TRANSCRIPCIONAL

Para investigar si la disminución en los niveles de expresión de RAC3 observada por la administración de Rapa se debía a una inhibición de su

expresión génica, se realizaron experimentos de RT-qPCR en distintas líneas celulares que fueron tratadas con Rapa 100nM por 24 horas. En concordancia con los resultados obtenidos por *western blot*, los niveles de ARNm de RAC3 también disminuyeron de modo significativo por la administración del inhibidor de la vía mTOR, como se muestra en la Figura 42, demostrando entonces que la acción de Rapa ocurre también a nivel transcripcional.

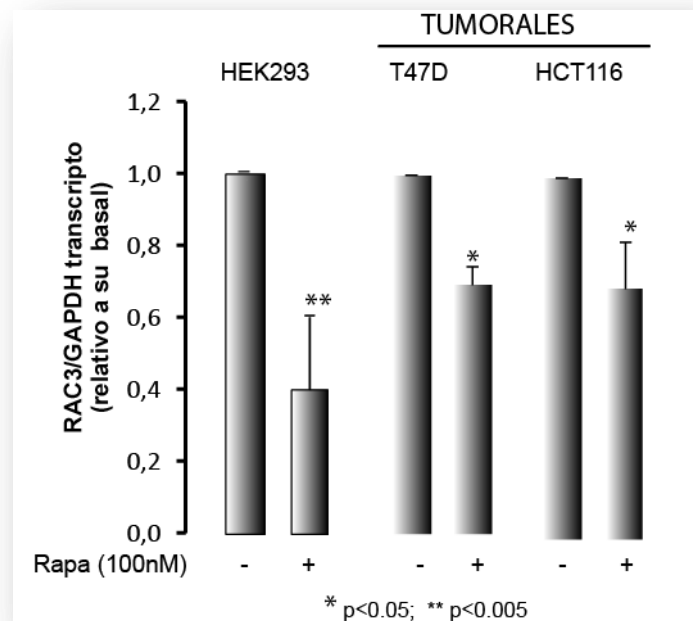


Figura 42. El inhibidor de la vía mTOR Rapamicina disminuye los niveles de expresión de ARNm de RAC3. Expresión del ARN mensajero de RAC3 determinada por RT-qPCR en distintas líneas celulares estimuladas por 24 horas con Rapa 100nM. El diagrama de barras corresponde al promedio obtenido de hRAC3 normalizado con GAPDH +/- el DS y relativizado con la condición control; analizados por el test de Tukey's.

Como desarrollamos ampliamente en la Introducción RAC3 contribuye al desarrollo tumoral por numerosos mecanismos. En este sentido, nuestro grupo ha demostrado en trabajos ya publicados que la sola sobre-expresión de RAC3 es suficiente para proteger a las células de la apoptosis y que además para hacerlo involucra acciones citoplasmáticas [228, 284].

II. iii. LOCALIZACIÓN DE RAC3 EN TUMORES NO DEPENDIENTES DE HORMONAS

Como se mencionó en la Introducción, RAC3 se encuentra sobre-expresado muchos tipos tumorales no hormono-dependientes. Además, como hemos descripto, las acciones de RAC3 como oncogén no solo se deben a su función como coactivador. Más aún, su localización en tumores de mama es citoplasmática y algo nuclear. Por esta razón resultó interesante investigar la expresión y localización de RAC3 en tumores de colon y riñón. Para ello se realizaron ensayos inmunohistoquímicos contra RAC3 sobre muestras parafinadas de cortes de biopsias humanas de riñón y colon.

Como se muestra en la Figura 43, en las muestras de riñón analizadas RAC3 arrojó una positividad mayor al 30% en la zona tumoral con respecto a la no tumoral y además tiene una clara localización nuclear. Por otro lado, en el caso de tumores de colon, como se ve en la Figura 44, la zona tumoral tiene mayor positividad de RAC3 *versus* la no tumoral; pero en este caso, contrariamente a las biopsias de riñón, la localización de RAC3 es claramente citoplasmática y ésta además coincide con la mayor positividad de RelA en las biopsias analizadas.

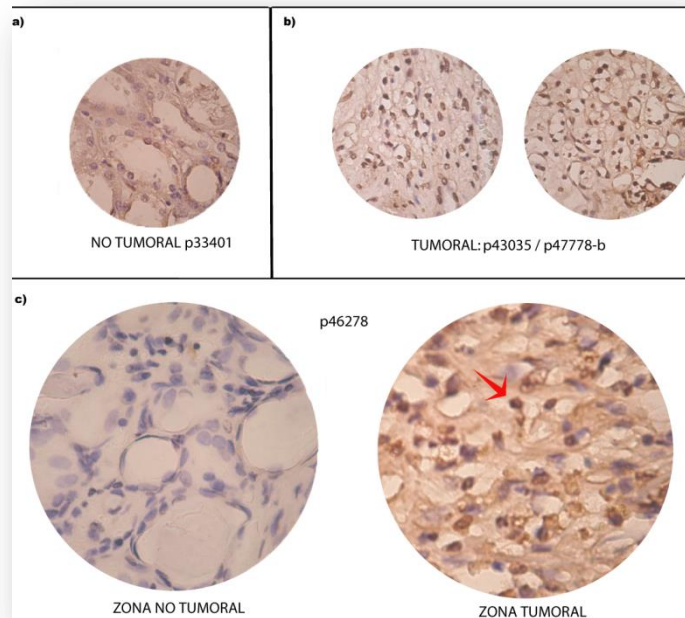


Figura 43. Expresión de RAC3 en cortes renales. Inmunohistoquímicas contra el coactivador RAC3 en muestras de biopsias de pacientes de sexo masculino, positividad marrón y contratinción con hematoxilina. a) p33401: no tumoral; b) p43035 y p47778-b carcinoma renal de células claras; c) p46278 cortes de un mismo pacientes donde se muestra la tinción en la zona tumoral y no.

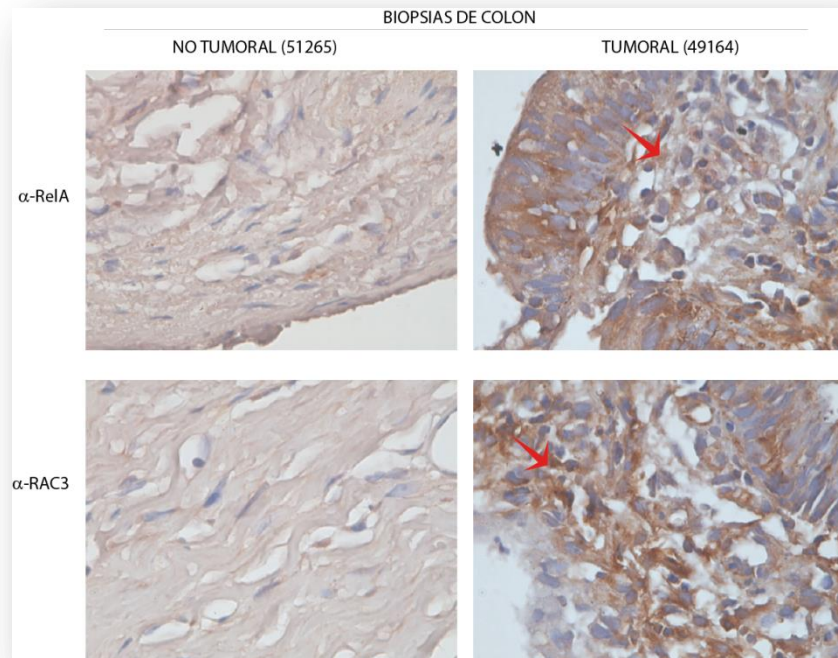


Figura 44. Expresión y localización de RAC3 en biopsias de colon. Inmunohistoquímicas contra el coactivador RAC3 y RelA en muestras de biopsias de colon. Positividad en marrón y contratinción con hematoxilina. N°51265 no tumoral y 49164 tumoral.

Demostramos previamente en trabajos ya publicados que uno de los mecanismos por los cuales RAC3 contribuye a la tumorigénesis es inhibiendo la apoptosis y además que para hacerlo involucra acciones tanto citoplasmáticas como nucleares [228, 284]. De acuerdo con estas evidencias, siendo RAC3 un oncogén se decidió investigar si la sobre-expresión de RAC3 cumplía algún rol en la autofagia.

II. iv. LA SOBRE-EXPRESIÓN DE RAC3 INHIBE LA AUTOFAGIA

Tal como mencionamos otro mecanismo muy relevante en tumores es la autofagia en los que paradójicamente posee un rol dual: de inhibición en estadios tempranos del tumor o de promoción en etapas posteriores o quimioterapia [307].

Con el objeto de investigar si existía una conexión entre la expresión de RAC3 y la autofagia se transfectaron células HEK293 con el vector de expresión de RAC3 o vector vacío (VV) y se sometieron a condiciones de ayuno con medio EBSS o con 0,5uM de Rapa en medio completo (MC) por 6 horas. El incremento en los niveles de expresión de RAC3 al transfectar se confirmó por RT-qPCR y por *western blot* (Figura 45-A Y B), respectivamente.

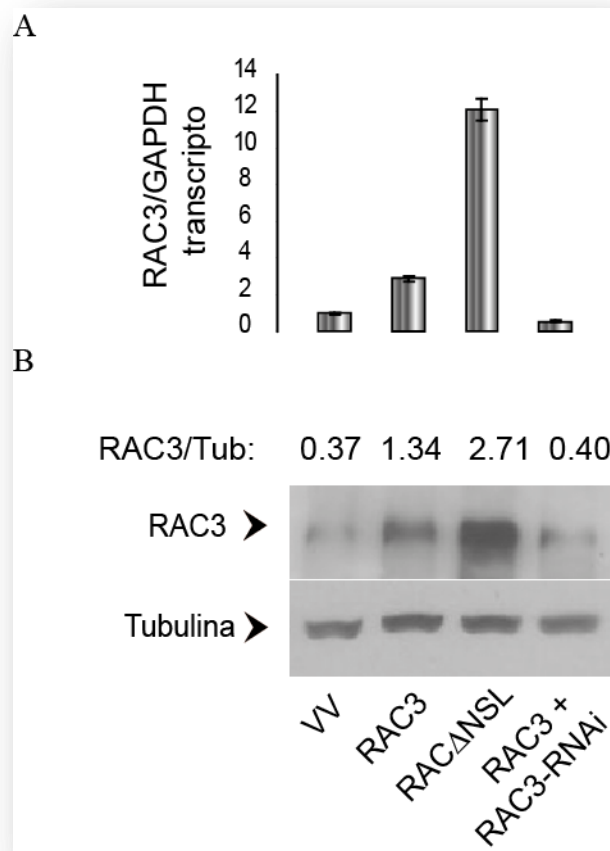


Figura 45. Control de niveles de expresión de RAC3 post-transfección en células HEK293.

A) RT-qPCR de células HEK293 transfectadas con vector vacío (VV) o bien el vector de expresión de RAC3, RAC3 Δ NLS, o co-transfectadas con RAC3 + RAC3-RNAi. El diagrama de barras muestra el promedio por triplicado \pm DS del ARNm de hRAC3 normalizado con GAPDH y relativizado a la condición control. **B)** *Western Blot* contra RAC3 de células HEK293 transfectadas de igual manera que en A) y relativizados con la proteína de expresión constitutiva Tubulina, se indican las relaciones de expresión obtenidas en forma numérica.

Como se ve en la Figura 46 las células con RAC3 endógeno (VV) muestran un 10% de autofagia basal que se ve incrementado en un 70% en ayuno y a un 35% por el tratamiento con Rapa, cuantificado mediante tinción con monodancylcadaverina (MDC) (ver Materiales y Métodos). Sin embargo, las mismas células transfectadas con RAC3 si bien muestran un 35% de autofagia basal, al inducirse la autofagia por ayuno estos niveles disminuyen significativamente a 10% y lo mismo se observa al tratar con Rapa.

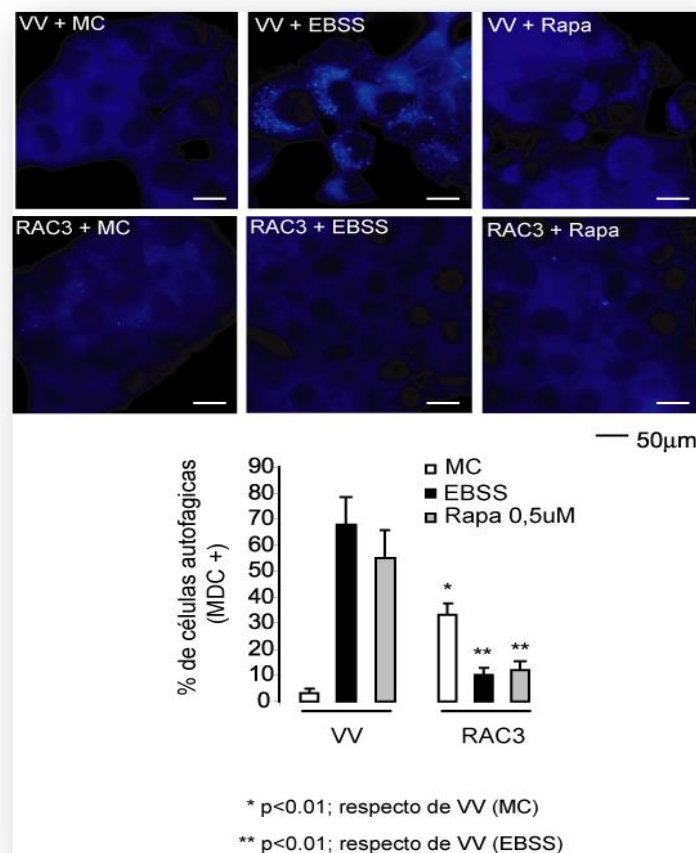


Figura 46. La sobre-expresión de RAC3 disminuye la autofagia. a) Células HEK293 transfectadas con el vector de expresión de RAC3 (pCMX-HA-RAC3) o con vector vacío (VV) cultivadas con medio completo (MC) o en condiciones que inducen la autofagia por 6 horas: ayuno con medio EBSS o con Rapa (0,5uM). El diagrama de barras muestra el porcentaje de células autofágicas por tinción con Monodancylcadaverina (MCD) +/- DS.

Estas observaciones fueron confirmadas en las mismas células co-transfectadas con el vector de expresión de RAC3 más el vector de marcación específico de autofagosomas RFP-LC3, como se muestra en la Figura 47. No se observaron cuerpos apoptóticos, ni apoptosis en las condiciones ensayadas.

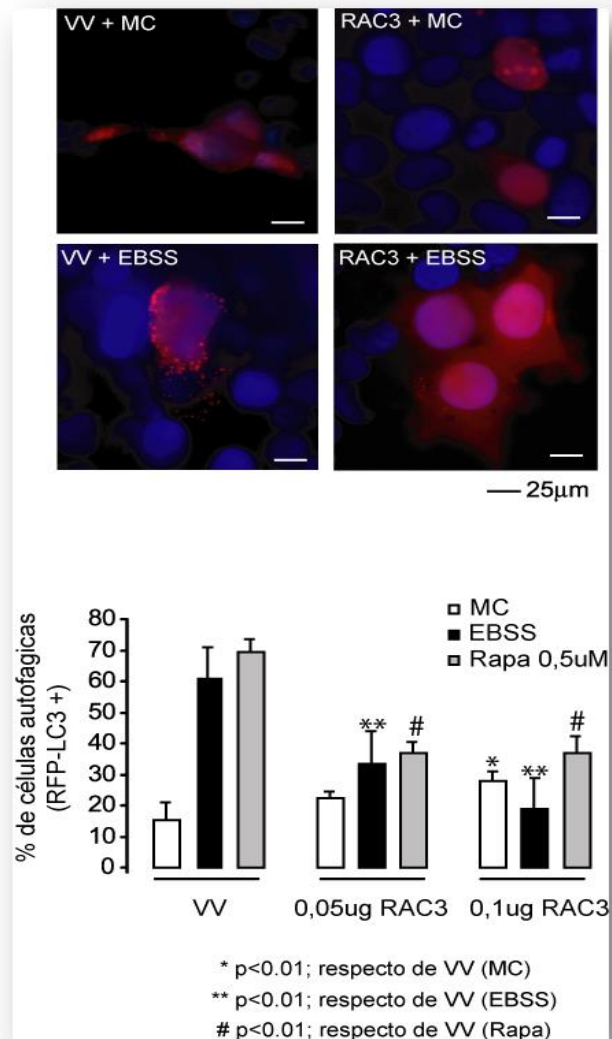


Figura 47. Disminución de los niveles de autofagia obtenidos al sobre-expresar RAC3.

Células HEK293 transfectadas con diferentes masas del vector de expresión de RAC3 (pCMX-HA-RAC3) o con vector vacío (VV) en presencia del vector de expresión para marcación específica de autofagosomas RFP-LC3 cultivadas con medio completo (MC) o en condiciones que inducen la

autofagia por 6 horas: ayuno con medio EBSS o con Rapa (0,5uM). El diagrama de barras muestra el porcentaje de células autofágicas por marcación específica con el fluorocromo RFP-LC3 +/- DS.

Dado que los resultados obtenidos muestran que al aumentar exógenamente los niveles de expresión de RAC3 disminuyen los niveles de células autofágicas, se planteó el interrogante de que ocurriría en células tumorales que sobre-expresan naturalmente RAC3.

II. v. CÉLULAS TUMORALES CON ALTO RAC3 ENDÓGENO NO RESPONDEN AL ESTÍMULO INDUCTOR DE AUTOFAGIA

Con el fin de evaluar ahora la respuesta en los niveles de autofagia en células tumorales con altos niveles de expresión de RAC3 endógeno, se utilizaron las líneas celulares con altos niveles de expresión de RAC3 endógenos HCT116 y T84 (ver Materiales y métodos) que fueron sometidas a condiciones de ayuno por 6 horas.

Como muestra la Figura 48, en las líneas tumorales analizadas existe un nivel de autofagia basal moderado si se compara con las células no tumorales, pero de acuerdo con los resultados previos donde se sobre-expresó a RAC3 exógenamente, estas líneas con alto RAC3 no muestran un aumento en los niveles de autofagia en respuesta al ayuno.

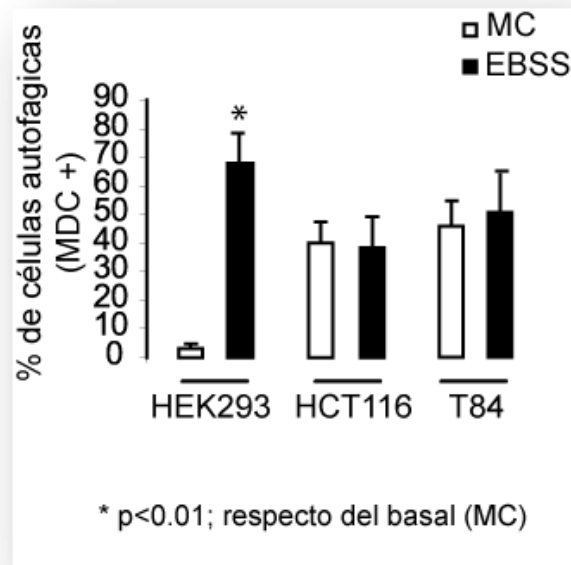


Figura 48. Células tumorales con alto RAC3 no muestran diferencias en los niveles de autofagia inducida por ayuno. Células no tumorales HEK293 y células tumorales HCT116 y T84 cultivadas con medio completo (MC) o en condiciones de ayuno con medio EBSS por 6 horas. El diagrama de barras muestra el porcentaje de células autofágicas por tinción con Monodancylcadaverina (MCD) +/- DS.

Dado que los resultados obtenidos pueden ser debidos a una característica particular de las células tumorales no necesariamente vinculados a los altos niveles de expresión de RAC3, se decidió investigar qué ocurriría en las mismas células al disminuir sus niveles de RAC3.

II. vi. LA DISMINUCIÓN DE LOS NIVELES ENDÓGENOS DE RAC3 EN CÉLULAS TUMORALES SENSIBILIZA A LA AUTOFAGIA

Se quiso determinar si la disminución de los niveles de expresión de RAC3, en células tumorales que lo sobre-expresan, podría modificar su sensibilidad a la inducción de la autofagia por distintos estímulos, así como la autofagia basal

constitutiva de estas células. Para ello células HCT116 fueron co-transfectadas con RAC3-RNAi ^[228] y RFP-LC3, para determinar los niveles de autofagia frente al ayuno o al tratamiento con Rapa mediante microscopía de fluorescencia.

Como se esperaba las células transfectadas con el vector conteniendo el control de RNAi mostraron niveles de autofagia comparables a las cultivadas con medio completo tanto al someterlas al ayuno como a Rapa, como se aprecia en la Figura 51.

Por otro lado, células HCT116 transfectadas con RAC3-RNAi si bien mantuvieron niveles basales moderados de autofagia respondieron con un aumento significativo de la autofagia frente al someterse a condiciones de ayuno así como al tratarlas con Rapa en comparación al control (MC) (Figura 49).

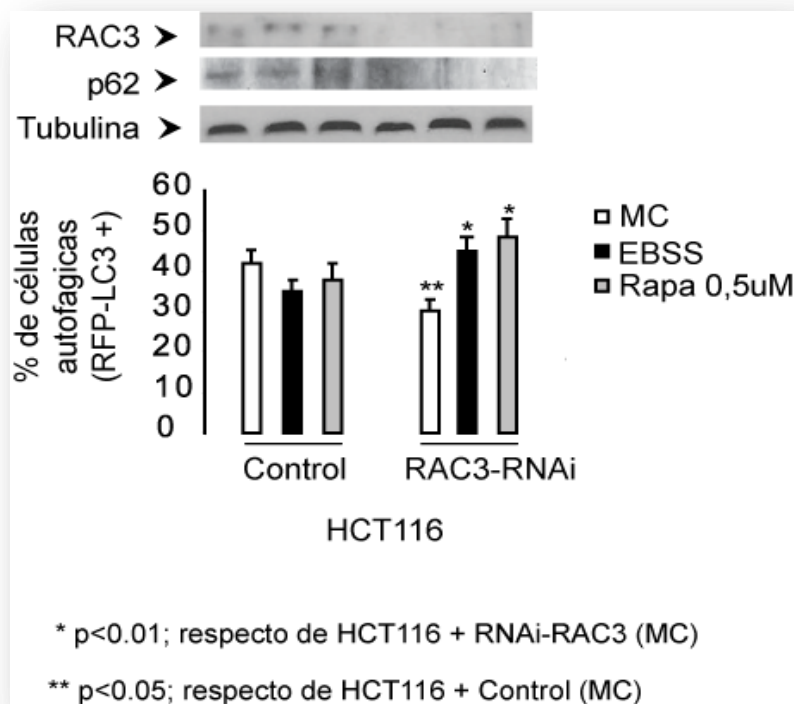


Figura 49. La disminución de RAC3 aumenta los niveles células en autofagia. Células tumorales HCT116 transfectadas con RAC3-RNAi o control, cultivadas con medio completo (MC) o en condiciones de ayuno con medio EBSS o bien tratadas con Rapa 0,5uM por 6 horas. Superior: *Western Blot* contra RAC3, p62 y la proteína de expresión constitutiva Tubulina. Inferior: El diagrama de barras muestra el porcentaje de células autofágicas por tinción con Monodancylcadaverina (MCD) +/- DS.

De acuerdo con los resultados obtenidos RAC3 está inhibiendo la autofagia y su sola disminución en células tumorales que lo sobre-expresan naturalmente las sensibiliza a la autofagia inducida por ayuno o por tratamiento con Rapa. Por lo que resulta importante profundizar que rol estaría cumpliendo esta molécula en la inducción del proceso autofágico.

II. vii. EL ROL DE RAC3 EN LA AUTOFAGIA IMPLICA SEÑALES NUCLEARES Y CITOPASMÁTICAS

RAC3 como coactivador de NRs y de NF- κ B, puede regular diversas respuestas celulares a nivel transcripcional; sin embargo como demostramos en trabajos ya publicados también tiene acciones citoplasmáticas en la protección de la apoptosis^[228] y como han demostrado otros autores en la metástasis^[384].

Por otra parte, la vía de NF- κ B y la autofagia poseen muchos reguladores comunes, por ejemplo NF- κ B puede inducir la expresión de proteínas anti-autofágicas como Bcl-2 o pro-autofágicas como Beclin-1, dependiendo del contexto genético y fisiológico^[385].

De acuerdo a estos antecedentes, se decidió investigar si el rol inhibitorio de RAC3 sobre la autofagia involucra acciones citoplasmáticas o nucleares y en este último caso si éstas son mediadas por NF- κ B. Para ello, se determinaron los niveles de autofagia en células HEK293 transfectadas con VV, con el vector de expresión de RAC3, con el vector de RAC3 con la etiqueta de translocación nuclear (NLS) mutada (RAC3 Δ NLS) o bien se co-transfectaron con RAC3 más el vector de expresión para I κ Bss, ya descripto.

Primeramente, como era de esperarse, la actividad de NF- κ B medida mediante ensayos reporteros κ B-Luc, aumentó en células transfectadas con RAC3 respecto a VV y la co-transfección con I κ Bss bloqueó completamente la actividad. En el caso de células transfectadas con RAC3 Δ NLS la actividad de NF- κ B no

mostró ninguna diferencia significativa con respecto a VV como se esperaba (Figura 50-a).

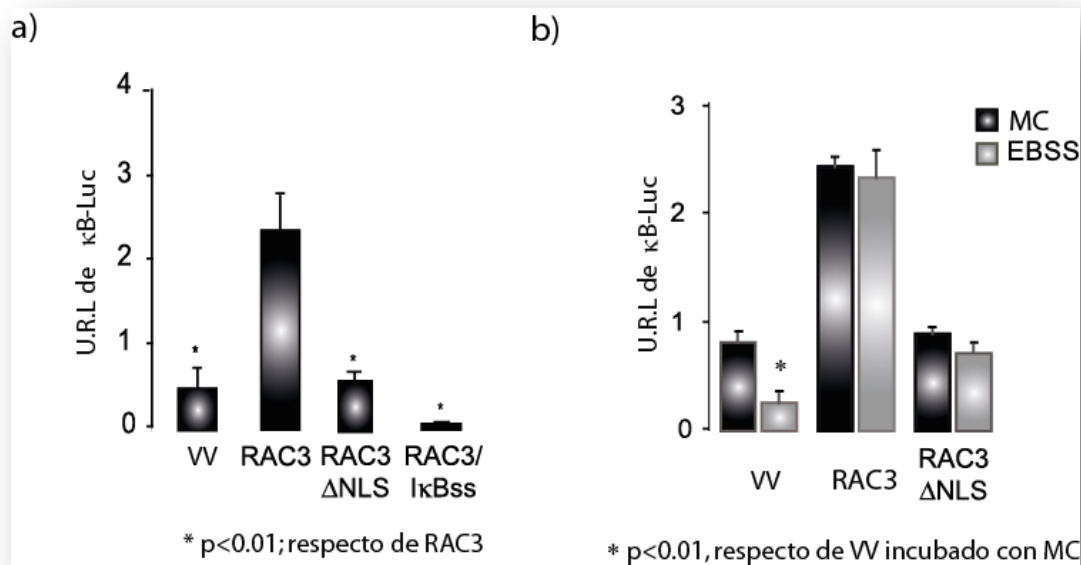
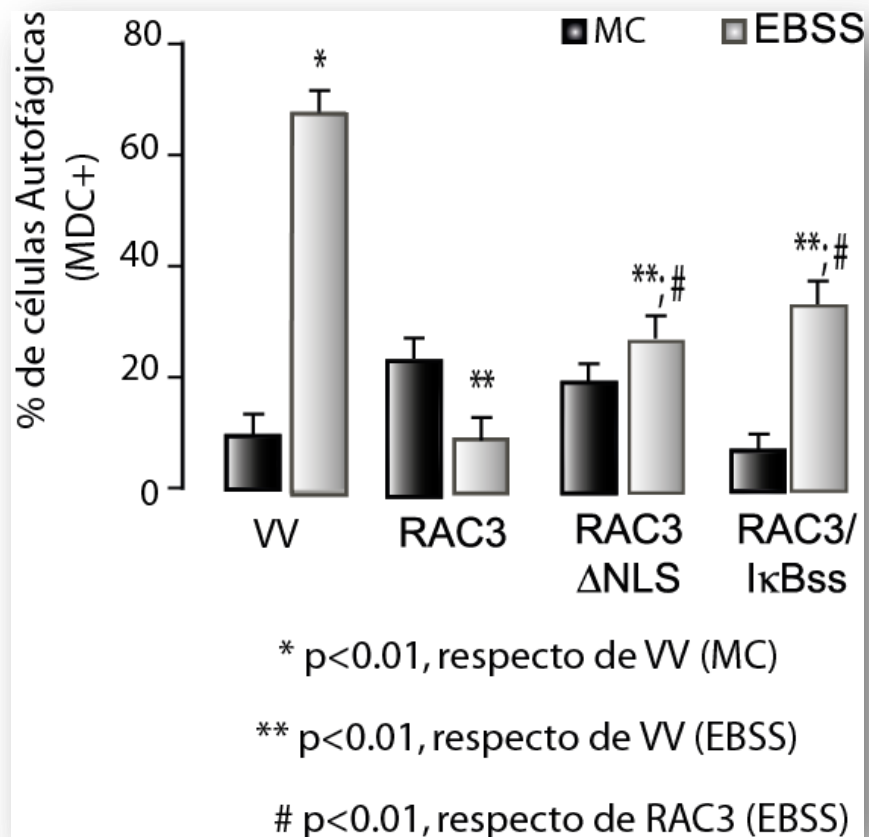


Figura 50. Actividad de NF- κ B en células sometidas al ayuno. Ensayos reporteros de κ B-Luc en células HEK293 transfectadas con VV, RAC3, RAC3 Δ NLS o co-transfectadas con RAC3 + I κ Bss **a)** Actividad κ B-Luc basal en las células transfectadas con medio completo (MC). **b)** Actividad κ B-Luc en las mismas células sometidas a ayuno con EBSS *versus* MC por 6 horas. El diagrama de barras muestra U.R.L: unidades relativas de luz \pm DS, analizados por el test de Tukey's.

Con el objeto de evaluar si NF- κ B es activado ante la autofagia inducida por ayuno y evaluar el posible rol de RAC3 Δ NLS, se analizó la actividad de NF- κ B por ensayos reporteros en condiciones de ayuno con EBSS. Como se muestra en la Figura 50-b, las células control (VV) mostraron una disminución significativa de la actividad de NF- κ B en condiciones de ayuno en comparación con medio completo (MC), probablemente como consecuencia de la inducción de la autofagia. Sin embargo, no se observó inhibición de la actividad de este factor de transcripción por ayuno en células transfectadas con RAC3, ni con RAC3 Δ NLS, mostrando niveles similares a las células cultivadas con MC.

Cuando se analizó el porcentaje de células autofágicas (MDC+) mediante microscopía de fluorescencia en las mismas células transfectadas y sometidas a iguales condiciones de ayuno, tanto las células transfectadas con RAC3 Δ NLS como las co-transfectadas con RAC3 + I κ Bss mostraron una reversión parcial pero significativa de la autofagia inducida por ayuno (RAC3 Δ NLS, 30 %; RAC3 + I κ Bss, 35%; RAC3, 10%, $p < 0,01$), como se muestra en la Figura 51-A. Resultados similares se obtuvieron con la técnica de *western Blot*, según la relación LC3-II/LC3-I, así como p62 (Figura 51-B).

A)



B)

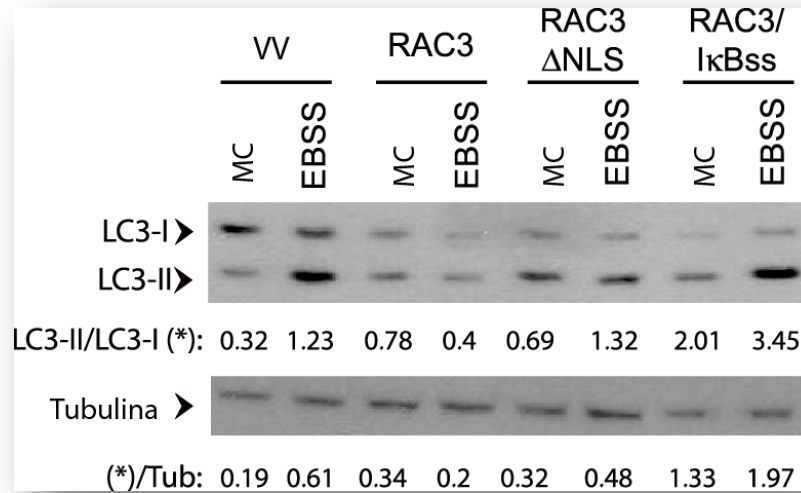


Figura 51. Niveles de células autofágicas en condiciones de ayuno. Células HEK293 transfectadas con VV, RAC3, RAC3ΔNLS o co-transfectadas con RAC3 + IκBss sometidas a condiciones de ayuno con EBSS o medio completo (MC) por 6 horas **A)** Porcentaje de células autofágicas. El diagrama de barras muestra el porcentaje de células autofágicas por tinción con Monodancylcadaverina (MCD) +/- DS. **B)** *Western Blot* contra LC3-I, LC3-II, p62 y la proteína de expresión constitutiva Tubulina. El diagrama de barras muestra la relación LC3-II/LC3-I en unidades densitométricas relativas (U.D.R.) obtenidas con el programa *ImageJ*.

Los resultados obtenidos indican que el rol inhibitorio de RAC3 sobre la autofagia, involucra acciones no nucleares y nucleares probablemente coactivando a NF-κB cuya actividad observamos disminuye en condiciones de niveles normales de RAC3 al inducir la autofagia por ayuno o estimulando con Rapa, y sin embargo no muestra diferencias significativas en presencia de altos niveles de RAC3 lo que correlaciona con la disminución de los niveles de autofagia.

II. viii. LA HIPOXIA INDUCE LA AUTOFAGIA EN CÉLULAS TUMORALES

Como se mencionó en la Introducción la autofagia no solo es disparada por deficiencia de nutrientes o Rapa, sino también bajo condiciones de estrés celular, daño mitocondrial y por condiciones de hipoxia que involucran al factor de transcripción HIF-1 α [305]. Además como mencionamos la autofagia tiene un rol dual en tumores.

Es por ello que se decidió investigar que ocurría con RAC3 y la autofagia en un modelo que simule etapas pre-angiogénicas del desarrollo tumoral. Como ocurre cuando un tumor alcanza tamaños macroscópicos, ya que en su interior se generan condiciones de hipoxia provocadas por la nula o pobre vascularización [386], que además constituyen las señales necesarias para la inducción de la angiogénesis. Por lo nombrado, las condiciones de hipoxia que pueden inducir la autofagia tienen un rol importante en el desarrollo tumoral como mecanismo de supervivencia del tumor frente a condiciones de estrés.

De acuerdo con los resultados obtenidos respecto a la sensibilidad a la autofagia inducida por ayuno y Rapa, se quiso determinar en principio la sensibilidad a la autofagia inducida por hipoxia en células tumorales con altos niveles de expresión de RAC3.

Para ello se utilizaron 4 líneas celulares, como se muestra en la Figura 52 que se incubaron bajo condiciones de hipoxia por 12 horas. Luego se midió el cambio en los niveles de autofagia de acuerdo al procesamiento de LC3 por la técnica de *western blot*, determinando la relación LC3-II/LC3-I, así como la degradación de p62.

Los resultados obtenidos muestran que células tumorales con niveles naturalmente elevados de RAC3 y una moderada autofagia basal, si bien son insensibles a la inducción de autofagia por ayuno o inhibición de la vía mTOR, contrariamente responden a la hipoxia incrementando sus niveles de autofagia, como se muestra en la Figura 52.

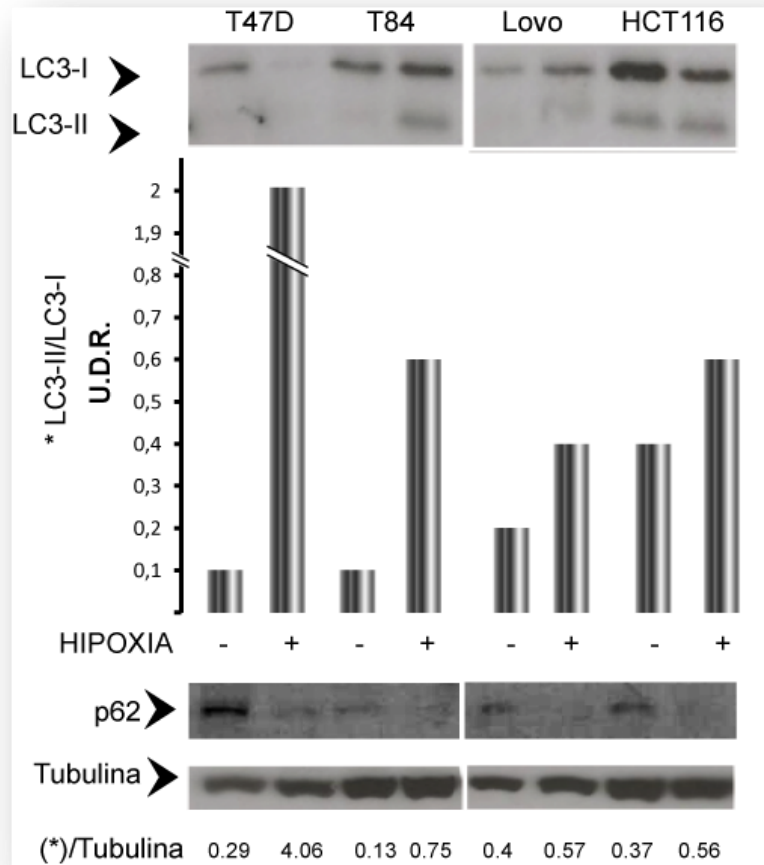


Figura 52. La hipoxia induce la autofagia en células tumorales. *Western Blot* contra LC3-I, LC3-II, p62 y la proteína de expresión constitutiva Tubulina de distintas líneas celulares tumorales sometidas a condiciones de hipoxia o normoxia por 12 horas. El diagrama de barras muestra la relación LC3-II/LC3-I en unidades densitométricas relativas (U.D.R.) obtenidas con el programa *ImageJ*.

Los resultados obtenidos sugieren que, o bien, los niveles elevados de RAC3 tienen un rol protector en la autofagia inducida por ayuno y Rapa, pero no en la inducida por hipoxia, o, bien también tienen un rol protector en esta ruta, pero sus niveles de expresión pueden estar siendo regulados por hipoxia.

II. ix. LA HIPOXIA INDUCE LA AUTOFAGIA MIENTRAS DISMINUYE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE RAC3

Hipoxia, ayuno, estrés y autofagia son fenómenos comunes en el proceso de desarrollo tumoral, y RAC3 se encuentra sobre-expresado en muchos tipos tumorales. Según los resultados hasta aquí presentados, la sobre-expresión de RAC3 tiene un rol protector en la autofagia inducida por ayuno e inhibición de la vía mTOR pero parece resultar insuficiente para la protección de autofagia inducida por hipoxia.

Sin embargo, también sería posible que a pesar de su rol protector, los niveles de RAC3 no permanecieran elevados de modo constitutivo en las células tumorales y que su expresión fuera inhibida por hipoxia, generando las condiciones adecuadas para la autofagia que permitan la supervivencia tumoral.

Para evaluar esta hipótesis, se determinaron los niveles de RAC3 en distintas líneas celulares tumorales en condiciones de normoxia o hipoxia por 12 horas. Como se muestra en la Figura 53 las líneas celulares sometidas a hipoxia mostraron una disminución en la expresión proteica de RAC3 respecto de sus controles (normoxia).

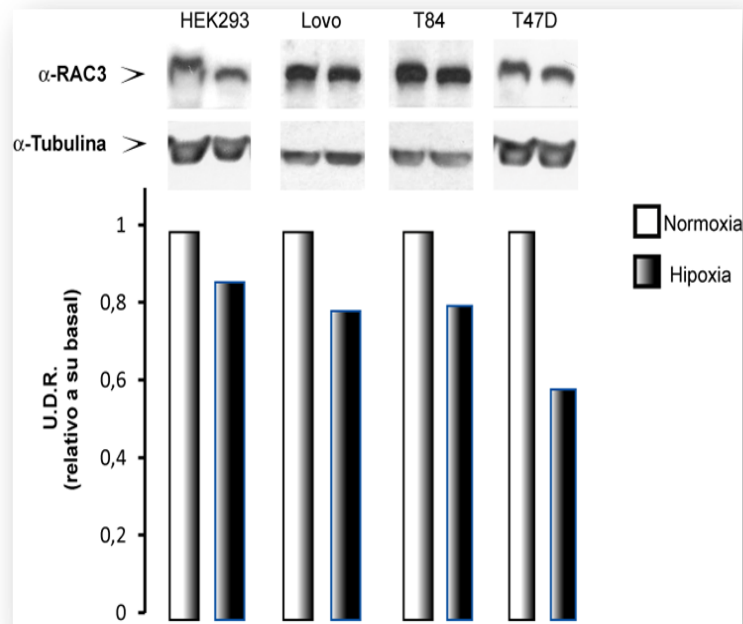


Figura 53. Los niveles proteicos de RAC3 disminuyen en condiciones de hipoxia. *Western blot* contra RAC3 de distintas líneas tumorales incubadas por 12 horas en condiciones de hipoxia o normoxia. Las barras muestran unidades densitométricas relativas de RAC3 relativizadas con la proteína de expresión constitutiva Tubulina obtenidas con el programa *ImageJ*.

Con el fin de evaluar si la disminución de RAC3 en condiciones de hipoxia podía ser consecuencia de la disminución de su ARN mensajero, se realizaron experimentos de RT-qPCR con extractos de ARN total de los mismos experimentos analizados a nivel proteico. Los resultados obtenidos demuestran que la hipoxia afecta la expresión génica de RAC3 a nivel transcripcional como se ve en la Figura 54.

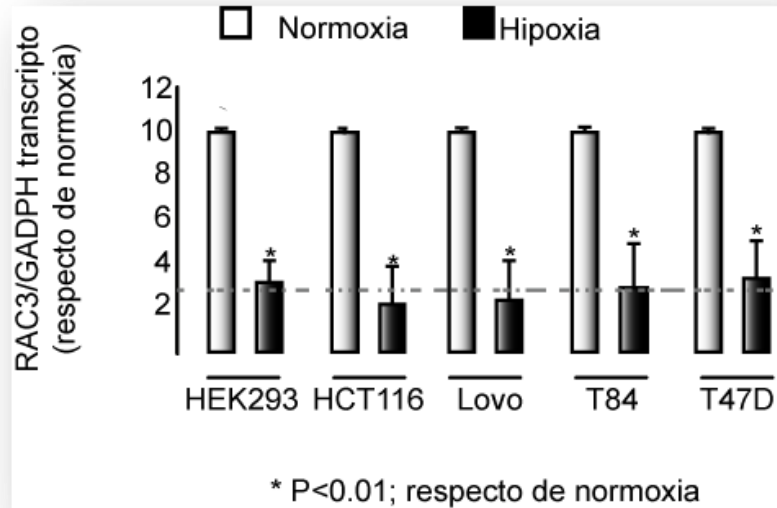


Figura 54. El ARNm de RAC3 disminuye significativamente en condiciones de hipoxia.

Expresión del ARN mensajero de RAC3 determinada RT-qPCR sobre distintas líneas tumorales incubadas por 12 horas en condiciones de hipoxia o normoxia. El diagrama de barras muestra el promedio obtenido de RAC3 normalizado con GAPDH +/- el DS y referidos a su condición control (normoxia), analizados con el test de Tukey's.

Estos resultados sugieren que la hipoxia induce la inhibición de la expresión RAC3, permitiendo que se produzca la autofagia y así garantizar la supervivencia tumoral hasta la generación de nuevos vasos sanguíneos con oxígeno y nutrientes. Si esta hipótesis fuera correcta, sería factible encontrar que en muestras de biopsia de tumores humanos la localización de RAC3 y la detección de autofagia resultaran mutuamente excluyentes. Con el fin de evaluar si esto puede ocurrir, se analizó la expresión y localización de RAC3 y LC3 mediante inmunohistoquímica en biopsias humanas de adenocarcinoma de colon.

Como muestra la Figura 55 en todos los casos, RAC3 se encontró en la cercanía de zonas vasculares, mientras que LC3 se observó principalmente en las zonas que rodean a los tejidos necróticos. De esta manera al menos en las muestras analizadas, la autofagia y RAC3 mostraron ser mutuamente excluyentes.

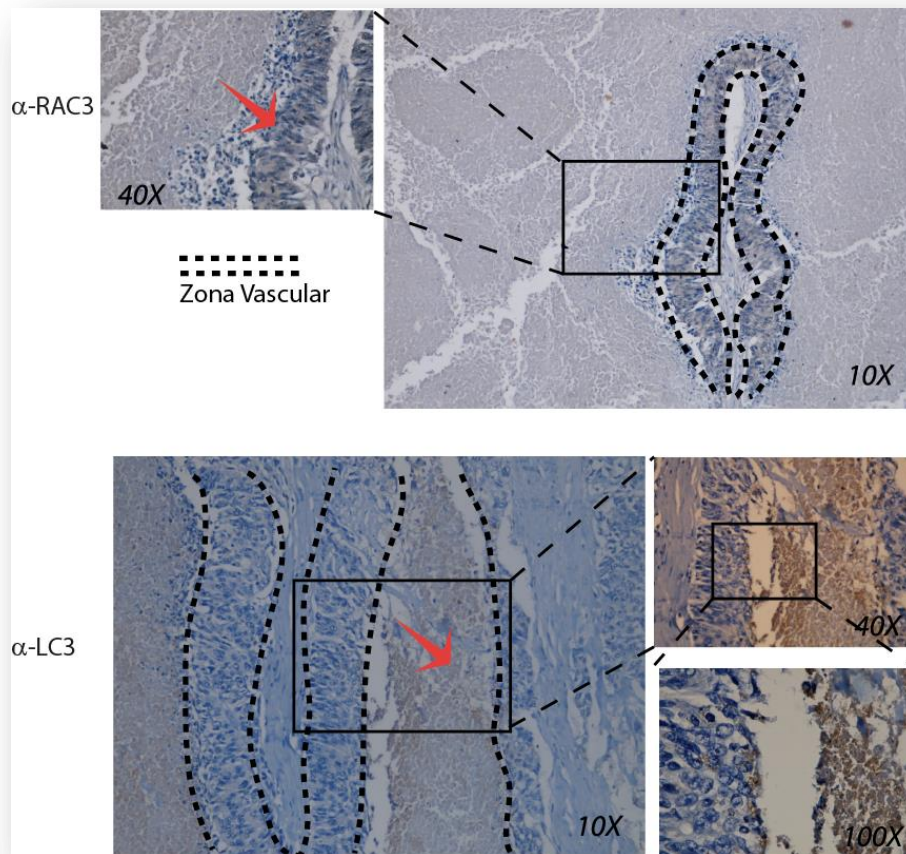


Figura 55. Expresión y localización de RAC3 y LC3 en biopsias de adenocarcinoma de colon. Inmunohistoquímicas contra el coactivador RAC3 y el marcador específico de autofagosomas LC3 en muestras de biopsias de adenocarcinomas de colon. Positividad en marrón. Se muestra la zona vascular con líneas discontinuas.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la disminución de RAC3 tanto a nivel transcripcional como proteico, podría estar afectando a su vez la actividad de su propio promotor, que además hallamos bioinformáticamente posee etiquetas putativas de pegado para HIF-1 α .

II. x. LA HIPOXIA AFECTA LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DE RAC3

Se quiso determinar si la disminución del ARN mensajero de RAC3 podría ser consecuencia de la disminución de su expresión génica por una inhibición de actividad de su propio promotor. Para investigarlo, se realizaron ensayos reporteros en células HEK293 transfectadas con la construcción promRAC3-Luc, incubadas por 12 horas en condiciones de hipoxia o normoxia.

Tal como se muestra en la Figura 56, la actividad del promotor disminuyó significativamente al incubarse en condiciones de hipoxia, por lo que podemos concluir que la disminución en los niveles de expresión de RAC3 se debe al menos a la disminución de la actividad de su promotor.

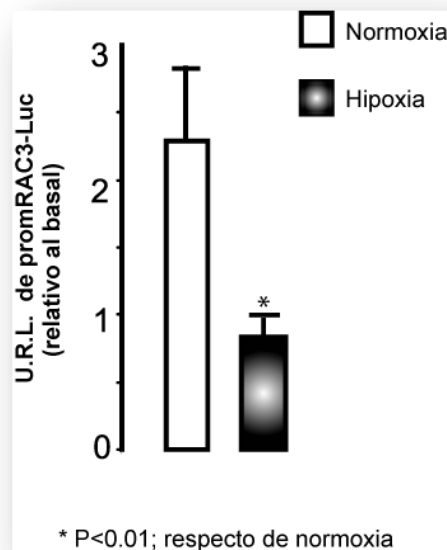


Figura 56. La hipoxia disminuye la actividad del promotor de RAC3 clonado. Ensayos reporteros en células HEK293 transfectadas transientemente con una construcción conteniendo el gen de Luciferasa bajo el control del promotor de RAC3 e incubadas por 12 horas en hipoxia o normoxia. El diagrama de barras muestra U.R.L.: unidades relativas de luz +/- DS, analizados por el test de Tukey's.

De acuerdo con todos los resultados obtenidos la hipoxia induce la disminución de la expresión génica de RAC3, generando probablemente un ambiente permisivo para el proceso de autofagia.

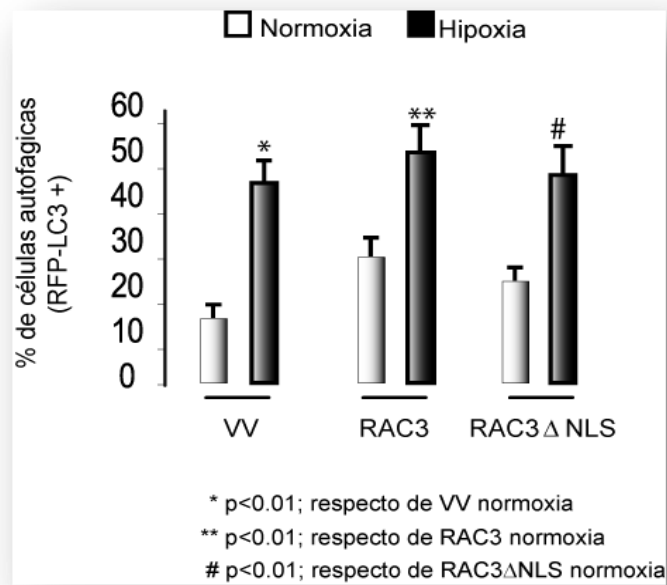
Si esta hipótesis fuera correcta, la sobre-expresión de RAC3 en forma exógena, por transfección de un vector de expresión constitutiva de RAC3, debería revertir el ambiente permisivo generado por hipoxia e inhibiendo la autofagia.

II. xi. LA SOBRE-EXPRESIÓN DE RAC3 ES INCAPAZ DE REVERTIR LA AUTOFAGIA INDUCIDA POR HIPOXIA

Con el propósito de investigar si nuestra hipótesis era correcta, se realizaron experimentos en células HEK293 transfectadas con vectores de expresión para RAC3, RAC3 Δ NLS o vector vacío y se incubaron en condiciones de hipoxia o normoxia por 12 horas. Luego se determinaron los niveles de autofagia por microscopía de fluorescencia, la relación LC3-II/LC3-I y niveles proteicos de p62 por la técnica de *western blot*.

Sin embargo, como se observa en la Figura 57-A y B, la sobre-expresión de RAC3 así como también la de RAC3 Δ NLS fue incapaz de inhibir la autofagia inducida por condiciones de hipoxia.

A)



B)

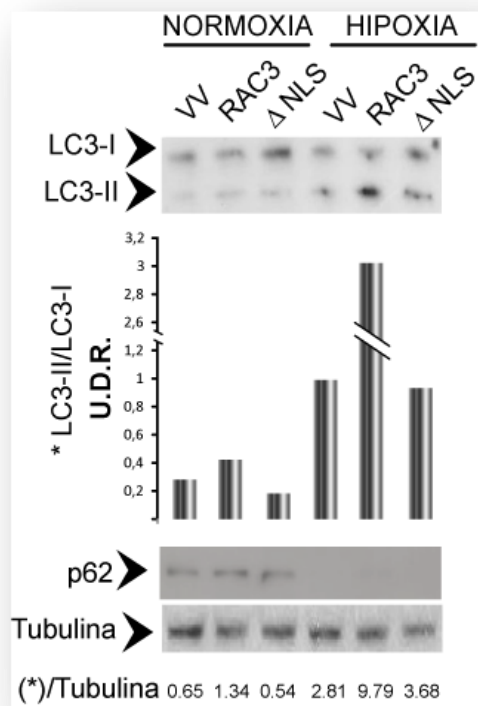


Figura 57. La sobre-expresión de RAC3 no revierte la autofagia inducida por hipoxia. A)

Porcentaje de células autofágicas de células HEK293 transfectadas con el vector de expresión de RAC3, RAC3 Δ NLS o con vector vacío (VV) en presencia del vector de expresión para marcación específica de autofagosomas RFP-LC3 e incubadas en condiciones de hipoxia o normoxia por 12 horas. El diagrama de barras muestra el porcentaje de células autofágicas con el fluorocromo RFL-LC3 +/-DS. **B)** *Western Blot* contra LC3-I, LC3-II, p62 y la proteína de expresión constitutiva Tubulina en células HEK293 transfectadas y tratadas de igual maneras que en A). El diagrama de barras muestra la relación LC3-II/LC3-I en unidades densitométricas relativas (U.D.R.) obtenidas con el programa *ImageJ*.

Si bien observamos que la hipoxia disminuye la expresión de RAC3 por una acción a nivel de su transcripción y actuando sobre su propio promotor, también observamos que la sobre-expresión de esta molécula bajo el control de un promotor que no es el propio y de expresión constitutiva, es incapaz de revertir los efectos de la hipoxia.

De acuerdo con estos resultados, podrían interpretarse de modo que una sobre-expresión de RAC3 es insuficiente para revertir la acción de la hipoxia y que son necesarias otras señales. Sin embargo, también existía la posibilidad que a pesar de la utilización de un modelo empleando un vector de expresión constitutiva, los niveles de RAC3 no llegaran a elevarse, tal vez, por otros posibles mecanismos por los cuales la hipoxia afectara sus niveles proteicos o actividad biológica.

II. xii. LA HIPOXIA DISMINUYE LA EXPRESIÓN DE RAC3 POR MECANISMOS ADICIONALES AL CONTROL DE SU PROMOTOR

Para evaluar si la disminución en los niveles de expresión de RAC3 por hipoxia era consecuencia exclusiva de la regulación a nivel de su promotor, se transfectaron células HEK293 con distintos vectores de expresión de RAC3 cuya expresión está bajo el control de otros promotores como es el caso de pCMX-HA-

RAC3 o del vector de expresión para la variante de RAC3 Δ NLS y fueron sometidas a condiciones de hipoxia o normoxia por 12 horas.

Resultó interesante que los niveles de expresión del ARNm de RAC3 medidos por RT-qPCR disminuyeron tanto en las células transfectadas con RAC3 (pCMX-HA-RAC3) como en las transfectadas con RAC3 Δ NLS (Figura 58), lo que sugiere que la disminución observada en los niveles de expresión de RAC3 ocurre además por mecanismos adicionales no relacionados al control de su propio promotor. Estos resultados avalan los resultados obtenidos en cuanto a la ausencia de protección de la autofagia inducida por hipoxia a través de RAC3 exógeno (Figura 57). De esta manera la hipoxia dispara mecanismos adicionales que acortan la vida media o inducen la degradación del ARNm de RAC3 necesarios para que se produzca la autofagia.

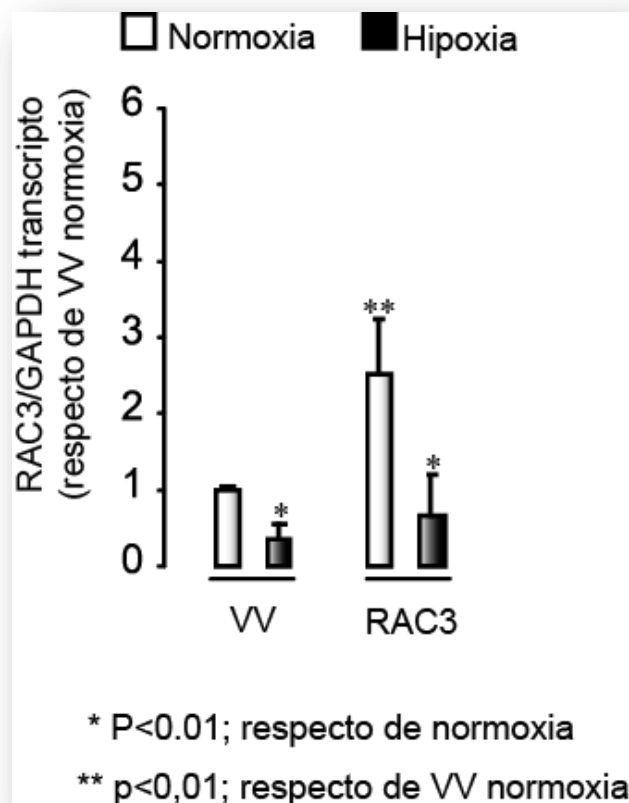


Figura 58. Los niveles de expresión de RAC3 disminuyen también bajo el control de un promotor exógeno. Expresión del ARN mensajero de RAC3 determinada por RT-qPCR en células HEK293 transfectadas con el vector de expresión para RAC3 (pCMX-HA-RAC3) o para RAC3 Δ NLS incubadas por 12 horas en condiciones de hipoxia o normoxia. El diagrama de barras corresponde al promedio obtenido de RAC3 normalizado con GAPDH +/-DS y relativizado con la condición control, analizados con el Test de Tukey's.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos podemos concluir:

A- LA RESPUESTA INFLAMATORIA CONTROLA LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE RAC3.

En particular:

1. La expresión del gen de RAC3 en el bazo se ve aumentada en la respuesta inflamatoria inducida con LPS y también aumenta ante la administración del análogo de glucocorticoides Dexametasona.
2. Si bien los niveles de expresión de RAC3 *in vivo* se ven aumentados ante señales pro- y anti-inflamatorias, la activación simultánea de ambas vías *in vivo*, resulta en un antagonismo mutuo.
3. Los niveles de expresión de RAC3 *in vitro* aumentan ante el estímulo con TNF, una de las citoquinas inducidas tempranamente en la respuesta inflamatoria.
4. El aumento en los niveles de RAC3 por TNF involucra al menos las vías de p38 y NF- κ B.
5. NF- κ B activado, actúa positivamente sobre el promotor de RAC3 actuando en forma directa por unión a una de sus etiquetas blanco identificadas en el mismo.
6. En condiciones experimentales similares a las fisiológicas normales, en que la cantidad de otros coactivadores de la familia es limitante, la coactivación de RAC3 es fundamental tanto para la transactivación

del factor de transcripción NF- κ B y de GR como para el clásico antagonismo mutuo entre ambas señales.

B- SEÑALES QUE INDUCEN AUTOFAGIA INHIBEN LA EXPRESIÓN DE RAC3, MIENTRAS QUE SU SOBRE-EXPRESIÓN TIENE UN ROL PROTECTOR DE ESTE PROCESO.

En particular:

1. La inhibición de la vía mTOR y la hipoxia inhiben la expresión de RAC3
2. La sobre-expresión de RAC3 por transfección en células no tumorales inhibe la autofagia inducida por distintos estímulos.
3. Las células tumorales son sensibles a la inducción de autofagia por hipoxia debido a la inhibición de la expresión de RAC3 a nivel transcripcional y post-transcripcional.

De todo lo mencionado se desprende:

RAC3 es un oncogén que a diferencia de muchos otros descriptos, desempeña su rol oncogénico por sobre-expresión, no requiriendo de mutaciones específicas para esta acción, se encuentra en cantidades limitantes en células normales y sobre-expresado en células tumorales. Por lo tanto, el control de su expresión sería un mecanismo clave en tumorigénesis. Demostramos que la respuesta inflamatoria controla positivamente su expresión, lo cual, es sabido lleva a un aumento de la proliferación tumoral, resistencia a apoptosis y a la autofagia, como demostramos en este trabajo de tesis. Por otro lado, las señales involucradas en la supervivencia tumoral, como las inductoras de autofagia, tienen un efecto inhibitorio de su expresión.

Estos hallazgos resultan de particular importancia para el conocimiento de la evolución tumoral en torno de sus interacciones con el microambiente, donde es factible el aumento local de la respuesta inflamatoria, así como la inducción de autofagia para la supervivencia tumoral previo a la iniciación de angiogénesis.

DISCUSIÓN

Como hemos desarrollado en la Introducción de esta tesis, el coactivador de receptores nucleares RAC3 fue descrito originalmente como específico para este tipo de receptores y además, dado que se lo había hallado en altos niveles en tumores respondedores a hormonas, se asoció su actividad con el aumento en la expresión de los genes blanco de receptores nucleares. Sin embargo, el descubrimiento posterior de su rol coactivando a NF- κ B^[46], sentó las bases para la investigación de su posible contribución en otro tipo de tumores y por otras cascadas de señales no necesariamente vinculadas a receptores de hormonas esteroideas. Así fue, que también se lo encontró en niveles elevados en numerosos tipos de tumores, incluyendo aquellos hormono-independientes (Tablas 1 y 2).

Si bien existen numerosas evidencias que permiten identificar a RAC3 como un oncogén, muchos aspectos lo diferencian de otros oncogenes conocidos, dado que reúne características singulares. Ante todo, su potencial oncogénico no se debe a mutaciones que alteran de modo constitutivo su actividad biológica, sino que, la sola sobre-expresión es suficiente.

De acuerdo con los primeros hallazgos respecto de la identificación de RAC3 como miembro de una familia de coactivadores p160, su actividad acetilasa de histonas, como remodelador de la cromatina, fue considerada su actividad biológica principal. Sin embargo, trabajos posteriores de nuestro grupo y otros investigadores demostraron que además tenía otras actividades biológicas en el citoplasma, asociándose a la maquinaria motora de citoesqueleto así como a dominios intracelulares de receptores de membrana^[228, 284, 304].

Las consecuencias de la sobre-expresión de RAC3 en tumores son más amplias de lo esperado, hallándose involucrado en muchas de las vías proliferativas desreguladas o sobre-activadas en tumores, como EGF^[55, 304], IGF-1^[52, 272] o mTOR^[229, 347], entre otras. Además, la sobre-expresión de RAC3 también se encuentra relacionada a cambios en el control del ciclo celular, dado que

demostramos que el aumento en los niveles de Ciclina D1 al sobre-expresar RAC3 es mediado por un complejo ER-RAC3-NF- κ B sobre el promotor de la Ciclina ^[273].

De acuerdo con otros trabajos previos del grupo, habíamos demostrado que la sobre-expresión de RAC3 tiene un rol protector de la apoptosis y estas acciones involucran efectos adicionales a su acción como coactivador, tanto de NF- κ B como de otros receptores nucleares. Más precisamente, parte de su actividad anti-apoptótica se debe a una acción citoplasmática de RAC3, modificando la actividad de kinasas y el tránsito de moléculas asociadas a citoesqueleto ^[228, 284].

Las ramificaciones de los efectos de una sobre-expresión de RAC3 más allá de su acción como coactivador es un tema de investigación relativamente nuevo. Gran parte de los trabajos tendientes a investigar el rol de RAC3 en tumorigénesis fueron realizados en células tumorales o animales transgénicos, en condiciones muy diferentes de lo que ocurre en individuos normales en que los niveles de RAC3 se encuentran en cantidades limitantes. Particularmente el uso de células tumorales como modelo, en las cuales RAC3 se encuentra elevado, ésta característica, por supuesto, no es la única diferencia respecto de células no tumorales, dado que además son portadoras de múltiples mutaciones incluyendo alteraciones cromosómicas groseras como aneuploidías y poliploidías. Al mismo tiempo todos los tumores son portadores de múltiples mutaciones afectando a oncogenes conocidos. En otras palabras, el desarrollo tumoral más allá de su origen o no, a partir de células madre tumorales involucra el acúmulo de numerosas mutaciones. A modo de ejemplo, una mutación de un gen supresor de ciclo como p53 o de Rb en homocigosis, limita el arresto en el ciclo celular y las posibilidades de reparación de errores en la replicación del DNA aumentando las probabilidades de adquisición de nuevas mutaciones en cada ciclo y su propagación a la progenie. Algo similar ocurre por mutación en cualquiera de las moléculas involucradas en estos mecanismos de reparación, de no existir mecanismos compensatorios, o aquellas que definen el destino de muerte o senescencia de una célula que ha acumulado numerosas mutaciones. Luego, para generar un tumor, la mutación de un oncogén no es suficiente. Esta debe aportar

la posibilidad de que ocurran otras mutaciones, o bien aportar efectos que sumados a otros genere una ventaja adaptativa y los requisitos para la generación de un tumor. Por lo tanto, RAC3 es un oncogén porque hay numerosas evidencias que así lo demuestran y afecta varios procesos relacionados con el desarrollo tumoral, pero, según la lógica de estos razonamientos, su sola sobre-expresión no debería ser suficiente para inducir una transformación tumoral. Nuestros resultados parecen sugerir lo contrario: según otros estudios del grupo, células no tumorales adquieren *in vitro* todas las propiedades de una célula tumoral, si bien aún no hemos comprobado que efectivamente sean capaces de generar tumores *in vivo* en ratones. No obstante, nuestro grupo y otros autores hemos observado que la sobre-expresión de RAC3 en células no tumorales induce el aumento en la expresión de metaloproteasas ^[299, 300] e indicadores de la TEM ^[239, 254, 259, 261, 269, 298], aumenta la proliferación en ausencia de suero y les confiere la capacidad de crecimiento independiente de anclaje.

A su vez, es numerosa y creciente la evidencia que demuestra el rol clave de esta molécula en la respuesta inflamatoria donde nuevamente en algunos casos también lo hace por acciones a nivel citoplasmático ^[9, 14, 126-128]. Al mismo tiempo, como desarrollamos en la Introducción son numerosos los trabajos que vinculan a las moléculas mediadoras de la inflamación ^[213, 214], a factores de transcripción como NF- κ B ^[217-225] y a las mismas células del sistema inmune con la tumorigénesis y el desarrollo tumoral ^[194, 206-209]. En este sentido demostramos previamente que TNF, lejos de producir la apoptosis en células de tumor mamario ER+, induce su proliferación, donde es clave la activación de NF- κ B ^[227].

Por todo lo mencionado RAC3 es un oncogén ^[47] muy singular, que se está comenzando a utilizar como indicador de pronóstico y resistencia a determinadas terapias, donde su tumorigenicidad está en estrecha relación con sus niveles de expresión, contrariamente a la mayoría de los oncogenes que se encuentran mutados o amplificados. Sin embargo, en lo que respecta a los mecanismos que controlan la expresión de RAC3, aunque hay evidencias que muestran que E2F es capaz de aumentarla ^[39] y otros a su vez que puede ser regulada por STAT6 ^[264] o

TGF- β ^[262] ninguno de estos hallazgos clarifica si es unívoco para la vía de un solo factor o un conjunto de señales, como tampoco si la desregulación de RAC3 es consecuencia o causa de la tumorigénesis. Aunque, si se toman en cuenta resultados previos del grupo, la sola sobre-expresión podría ser causa de tumorigénesis.

Lo cierto es que la sobre-expresión de la RAC3 parece ser la clave de su potencial oncogénico y hasta el presente la razón de su descontrol no ha sido esclarecida. Pues, en este trabajo de tesis se investigan los posibles mecanismos responsables del control de su expresión génica.

De acuerdo con nuestra hipótesis inicial era probable que tanto citoquinas inflamatorias como glucocorticoides puedan regular los niveles de expresión de ésta molécula, al activar vías en las que RAC3 participa y más aún coactiva a los factores de transcripción más importantes de éstas vías como GR y NF- κ B ^[387] ^[46].

Encontramos que la inducción de la respuesta inflamatoria en ratones al administrar dosis subletales de LPS aumentó significativamente los niveles de ARNm de RAC3 en un órgano muy importante del sistema inmune como es el bazo. Si bien el lipopolisacárido por si solo u otras señales que éste active podrían estar provocando este efecto, nuestros resultados *in vitro* muestran que al estimular células no tumorales con una de las principales citoquinas de la respuesta inflamatoria y el principal mediador del shock séptico como es TNF ^[388] la citoquina por si sola también aumentó los niveles de expresión de RAC3 a nivel transcripcional y proteico. En suma, también encontramos que TNF tiene un efecto directo sobre la actividad del promotor de RAC3 aumentándola significativamente.

Asimismo, aunque la citoquina puede activar otras vías de señalización además de la de NF- κ B como por ejemplo la vía mTOR ^[337], encontramos que el efecto de TNF fue revertido significativamente al inhibir la vía de NF- κ B con su inhibidor específico SZ, indicando que este factor está involucrado en la regulación de RAC3. De acuerdo con estos resultados también demostramos que la sobre-expresión de la subunidad RelA de NF- κ B tiene un efecto directo aumentando la actividad del promotor de RAC3 que además fue revertido al retener el factor en el

citoplasma con I κ B α s. La misma tendencia en estas condiciones experimentales se observó sobre los niveles de expresión de RAC3 a nivel de su ARNm y proteicos. En sumatoria también hallamos que al menos una de las etiquetas κ B halladas en el promotor de RAC3 resultó ser funcional ante el estímulo con TNF.

En consecuencia todos los resultados obtenidos sugieren que NF- κ B activo se une al promotor del gen RAC3, activado al menos por una de las citoquinas de la respuesta inflamatoria como TNF provocando el aumento que observamos en los niveles de expresión de RAC3 al inducir la respuesta inflamatoria administrando LPS.

Igualmente debe destacarse que el aumento sobre los niveles de expresión de RAC3 obtenido *in vivo* 24 horas post-administración de LPS es consecuencia de la inducción de la respuesta inflamatoria en un contexto fisiológico donde se controló la sobre-activación del sistema inmune que podría desencadenar en un shock ^[135] activando el eje HPA y consecuentemente liberando glucocorticoides. Por lo tanto, el aumento observado *in vivo*, probablemente es el resultado del equilibrio en la diafonía de señales pro- y anti-inflamatorias.

Por otra parte observamos que al administrar el glucocorticoide sintético Dexametasona conocido anti-inflamatorio también aumentó la expresión de RAC3 tanto *in vivo* como *in vitro* y más aún, encontramos que también regula positivamente la actividad del promotor de RAC3. Sin embargo la acción estimuladora del glucocorticoide podría ser debido a una acción indirecta, por algún otro mediador afectado por la presencia de Dexametasona y capaz de reconocer alguna secuencia en el promotor de RAC3. Además se ha reportado la regulación positiva de otros genes por ambos factores a pesar de su mutuo antagonismo ya conocido ^[389]. No obstante sería interesante determinar si ésto podría tener relación con otras acciones conocidas de los glucocorticoides en vías no directamente relacionadas al sistema inmune en las que RAC3 está involucrado ^[129, 130] o incluso se podría especular que se trata de una función de los CGs no inmunosupresora tal como han reportado diversos trabajos, al menos en lo que respecta al sistema inmune innato ^{[139] [390] [391]}, como por ejemplo el

aumento de TLR2 inducido por los CGs en células epiteliales que aumenta así la secreción de IL-6 e IL-8 críticas en la inducción de la respuesta de fase aguda y quimiotaxis de una gran variedad de células ^[121].

En lo referente al efecto de la activación de ambas vías sobre la expresión de RAC3, de acuerdo con nuestros resultados, la administración de LPS + DEX *in vivo* y el co-estimulo con TNF + Dex *in vitro*, no provocó sinergismo en la regulación de RAC3, como si se ha reportado para otros genes blanco de ambos factores ^[389] indicando la existencia de mecanismos adicionales seguramente relacionados con el conocido antagonismo entre señales pro- y anti-inflamatorias que no deben ser excluidos. De todas maneras, la activación de ambas señales *in vivo* resultó en el mutuo antagonismo restableciendo los niveles de ARNm de RAC3 al obtenido en condiciones basales, como era esperado. Particularmente, el aumento sinérgico obtenido al medir la actividad del promotor de RAC3 co-estimulando con TNF y Dex podría deberse a que en estos ensayos si bien se usó un fragmento considerable del promotor RAC3 (2,3Kb aprox.) que además incluye al primer exón y que como se muestra en la sección “Resultados”, posee muchas secuencias regulatorias putativas, existe la posibilidad de que algunas secuencias regulatorias adicionales e importantes para mediar la transrepresión del gen de RAC3 a este nivel no estén incluidas. Paralelamente y de acuerdo con nuestros resultados *in vitro* al estimular con la citoquina TNF dado que el antagonismo en la regulación de su expresión solo fue observado *in vivo*, estaría sugiriendo probablemente que la conocida inhibición de la síntesis de citoquinas inflamatorias mediada por los CGs ^[138] podría ser un paso limitante en el aumento de la expresión RAC3. Sin embargo, la causa de las diferencias obtenidas en las condiciones ensayadas entre los resultados *in vivo* e *in vitro* así como el mecanismo molecular preciso involucrado, queda por determinarse, aunque el antagonismo mutuo GR y NF- κ B parece ser el menos probable ^[46, 185].

Como hemos desarrollado en la Introducción, es numerosa la evidencia que demuestra el importante rol que cumple RAC3 en el sistema inmune ^[14, 38, 126-128]. En este sentido y en el marco de los resultados obtenidos encontramos también

que RAC3 resultó ser fundamental en los mecanismos de transactivación de NF- κ B y GR en una línea celular que tiene bajos niveles de toda la familia de p160^[228], tal como ocurre en condiciones fisiológicas normales. Observamos que la sola ausencia de RAC3 es un factor limitante para la transactivación tanto de NF- κ B como de GR cuya función no puede ser compensada, por lo menos en 24hs, por la actividad de otro coactivador.

Por otra parte, de acuerdo a trabajos ya publicados, si bien GR utiliza preferentemente a TIF-2 (GRIP1) en la transrepresión mediada por IRF3 para suprimir la expresión de colagenasa-3, IL- 8, y citoquinas^[177], también es posible que la falta de RAC3 desensibilice a las células para la acción de los CGs donde su liberación vía la activación del eje HPA juegan un rol central evitando una reacción inmune exagerada. En este trabajo encontramos que al menos en los tiempos y condiciones *in vitro* ensayados la expresión de RAC3 también resultó clave en el antagonismo mutuo entre ambos factores y si bien un trabajo realizado con ratones RAC3^{-/-} muestra que aun así, el tratamiento con DEX los rescató totalmente de la letalidad inducida por LPS^[14], todas las evidencias obtenidas surgen de experimentos realizados en animales *knockout*, donde muy probablemente se desarrolló algún mecanismo compensatorio de sus funciones a lo largo de su vida, vía otras moléculas.

Todos los resultados obtenidos tomados en conjunto sugieren que, en condiciones normales, el aumento de RAC3 en la respuesta inflamatoria podría ser un mecanismo molecular que asegura la expresión de genes blanco de NF- κ B y de GR requeridos en el curso normal y saludable de la respuesta inmune y anti-inflamatoria. Particularmente niveles de expresión bajos de esta familia de coactivadores son los se podrían encontrar en el ratón normal y tejidos humanos, mientras que la sobre-expresión constitutiva se relaciona con condiciones patológicas como tumores, tal como hemos desarrollado.

Entonces, siendo RAC3 un oncogén que contribuye al desarrollo de tumores cuando se sobre-expresa y como desarrollamos en la Introducción la respuesta inflamatoria sistémica o restringida al microambiente tumoral tiene un rol

importante en la oncogénesis, donde además ha sido ampliamente documentado intervienen citoquinas inflamatorias como TNF^[213, 214] y el mismo NF- κ B^[227]. Se podría vincular la regulación de RAC3 con la respuesta inflamatoria local y de los tejidos circundantes al tumor como un mecanismo importante que aumenta su sobre-expresión asociada a tumores, ya sea sumado a otras vías que también se encuentran desreguladas en los mismos, o bien, manteniendo altos sus niveles en etapas tempranas de la tumorigénesis o el desarrollo tumoral, por lo que los hallazgos obtenidos despiertan interés y ameritan una mayor investigación para una mejor comprensión de esta enfermedad.

Por otro lado demostramos previamente que RAC3 protege a las células de la apoptosis^[228, 284] por un mecanismo dependiente de NF- κ B pero que también involucra acciones a nivel citoplasmático activando kinasas y modificando el tráfico intracelular^[228, 284]. Sin embargo, no se había investigado nada sobre el posible rol de este coactivador en la autofagia, que como hemos desarrollado se trata de un proceso importante y paradójico en el desarrollo tumoral. La autofagia puede actuar como supresor en las primeras etapas, llevando a la célula tumoral a un fenotipo senescente^[392] y de hecho, la ausencia parcial o total de la autofagia donde falla la degradación del complejo p62 se asocia con inestabilidad genómica y mejoramiento del fenotipo tumoral^[393], sumado a esto, se han caracterizado numerosos tumores con mutaciones en sus genes *atg*. Contrariamente, la autofagia también es necesaria para el desarrollo tumoral, tal que una deficiencia completa de la misma podría ser perjudicial para el tumor. En este sentido modelos *in vivo* de *knockout* de genes *atg* o Beclin-1 demuestran que en condiciones de hipoxia pre-angiogénicas en el centro tumoral se observa necrosis celular y autofagia defectuosa^[386]. Por lo tanto la autofagia en tumores parece ser inhibida reversiblemente permitiéndole cumplir este doble rol dependiente del estadio tumoral.

En este trabajo utilizamos el inhibidor de la vía mTOR Rapamicina que como desarrollamos en la Introducción en algunos casos se utiliza como anti-tumoral y que de hecho se ha documentado los efectos anti-tumorales de un

rapálogo como RAD001 sobre tumores mamarios en ratones que sobre-expresan RAC3 ^[347]. De acuerdo con nuestros resultados el efecto que posee sobre el coactivador RAC3 fue dosis dependiente. En este trabajo de tesis encontramos que la Rapamicina disminuye los niveles de expresión de RAC3 sobre distintas líneas celulares tumorales. Estas observaciones resultan muy importantes para evaluar el uso de esta droga en individuos con tumores donde se encuentre desregulada la vía mTOR como ocurre frecuentemente en cáncer ^[342].

Por otra parte demostramos por primera vez que la sobre-expresión de RAC3 inhibe la autofagia inducida por ayuno y por la inhibición farmacológica de la vía mTOR con Rapa. A su vez, observamos que la mayoría de las líneas celulares tumorales que sobre-expresan RAC3 naturalmente, así como células no tumorales HEK293 transfectadas con el coactivador, muestran altos niveles basales de acumulación de vesículas LC3 positivas, mayormente en la periferia citoplasmática o pseudópodos sumándose a trabajos reportados previamente en relación al rol de la autofagia basal como un mecanismo natural de supervivencia de las células tumorales ^[307].

Respecto de la relación de NF- κ B, RAC3 y la autofagia, si bien se sabe que este factor de transcripción puede regular la expresión de proteínas que inhiben la autofagia ^[385, 394] y entonces podría pensarse que los altos niveles de RAC3 estén afectando la autofagia vía la transactivación de este factor, encontramos que aun cuando la sobre-expresión de RAC3 aumenta la actividad de NF- κ B ^[46] el bloqueo específico de su translocación al núcleo por co-transfección con I κ Bss solo revierte parcialmente el efecto inhibitorio ejercido por RAC3. Estos resultados indicarían que RAC3 inhibe la autofagia además, por otras señales no relacionadas con NF- κ B. En este sentido observamos que la sobre-expresión de RAC3- Δ NLS, incapaz de translocar al núcleo y actuar como coactivador también logra inhibir la autofagia indicando nuevamente que RAC3 podría estar utilizando otras señales adicionales y además no nucleares.

Las células tumorales con alto RAC3 endógeno y células HEK293 con alto RAC3 exógeno mostraron niveles de autofagia similares y a su vez similar

actividad de NF- κ B al incubarse en condiciones de ayuno respecto a las control, mientras que se observó la disminución de la actividad de NF- κ B en células que expresan niveles normales de RAC3, probablemente como consecuencia de la autofagia ^[385], sugiriendo que las células con alto RAC3 tienen una alta actividad basal de este factor, lo que es coherente siendo que RAC3 es su coactivador ^[46]. Por lo tanto, RAC3 parece inhibir la autofagia parcialmente por un mecanismo independiente de NF- κ B, pero una vez que ésta se inicia debido a la insuficiencia de niveles autolimitados de RAC3 para inhibirla, disminuye la actividad NF- κ B. En conclusión, RAC3 puede inhibir la autofagia, al menos, por mecanismos nucleares que implican la actividad de NF- κ B pero además por acciones citoplasmáticas por un mecanismo aún por determinar.

No obstante, también analizamos lo que ocurre con RAC3 y la autofagia en un modelo que reproduce etapas tardías del desarrollo tumoral, cuando éste alcanza tamaños macroscópicos y su masa celular central atraviesa indefectiblemente condiciones de hipoxia que, tal como hemos desarrollado es otro inductor de la autofagia ^[305]. Llamativamente encontramos que al someter células tumorales con altos niveles de RAC3 a condiciones de hipoxia disminuyeron significativamente los niveles de expresión de esta molécula tanto a nivel transcripcional como proteico. Por lo tanto, aunque se observa autofagia basal en estas células, la disminución de los niveles de expresión de RAC3 podría ser un paso requerido con el fin de permitir la autofagia en células tumorales sometidas a condiciones de hipoxia. Conjuntamente, en biopsias tumorales humanas analizadas mediante inmunohistoquímica con anticuerpos específicos hallamos que las células con elevada expresión de RAC3 *versus* las autofágicas se excluyeron mutuamente. Estos resultados avalan nuestras observaciones en las líneas celulares: solo se observa autofagia en las células donde los niveles de RAC3 fueron disminuídos.

Evidentemente la autofagia es clave en tumores, sin embargo, el hecho de que pueda tener un rol supresor en las primeras etapas del desarrollo tumoral, pero contrariamente ser necesario en etapas posteriores para el mantenimiento

del tumor y la espera en estado latente de condiciones de crecimiento adecuadas, es un tema actual en discusión. En este trabajo, proponemos por primera vez un modelo en el que una molécula coactivadora posee un rol esencial en la regulación de la autofagia donde demostramos que ambos, tanto RAC3 como la autofagia están regulados por condiciones de hipoxia. Por lo tanto, la hipoxia contribuye a la supervivencia de las células tumorales, induciendo la autofagia que le permite sobrevivir en condiciones hipóxicas y de deficiencia de nutrientes, además de promover la angiogénesis y de acuerdo a nuestros resultados ésto se logra a través de la inhibición de la expresión de RAC3.

Nuestros resultados permiten hipotetizar que probablemente, en etapas tempranas de la ontogenia tumoral, la sobre-expresión de RAC3 protege a las células tumorales de la muerte por autofagia, pero, más tardíamente, ante condiciones de estrés, por carencia de nutrientes y oxígeno, la expresión de esta molécula se inhibe y se dispara la autofagia como mecanismo de supervivencia tumoral, como vía para obtención de energía a través de la metabolización de moléculas u organelas propias de la célula. El microentorno inflamatorio local, podría cooperar en la reversión del fenómeno una vez restituidas las condiciones de estrés, aumentando nuevamente los niveles de RAC3 y preparando a las células para la invasión a otros tejidos.

Algo que se desprende de todo este razonamiento es que nuestros resultados sugieren que la sobre-expresión de RAC3 en tumores no es constitutiva, sino que aún en tumores, podría estar modulada por señales negativas como la hipoxia y otras positivas que aumentan su expresión como el microentorno inflamatorio local.

Estos resultados constituyen un aporte importante al conocimiento de las acciones oncogénicas de RAC3, que si bien es un blanco atractivo de ataque para futuras terapias anti-tumorales, el diseño de las mismas no es tarea fácil y la solución no sería simplemente anular su expresión, dado que solo se trata de una molécula sobre-expresada, que no requiere de mutaciones y además necesaria para el normal desarrollo y funcionamiento del sistema endócrino e inmune.

PUBLICACIONES

PUBLICACIONES

Los contenidos de este trabajo de tesis forman parte de las siguientes publicaciones:

1. **Alvarado CV**, Rubio MF, Fernández Larrosa PN et al. *The levels of RAC3 expression are up regulated by TNF in the inflammatory response. FEBS Open Bio* 2014; 4: 450-457.
2. Fernández Larrosa PN*, **Alvarado CV***, Rubio MF et al. *Nuclear receptor coactivator RAC3 inhibits autophagy. Cancer science* 2012; 103: 2064-2071. * Ambos autores comparten la primera autoría
3. **Alvarado CV**, Micenmacher S, Ruiz Grecco M et al. *La sobre-expresión de RAC3 es una señal transformante y proliferativa que contribuye al desarrollo tumoral. Medicina (Buenos Aires)* 2011; 71: 33-38.

ABREVIATURAS

4E-BP1/2	Factor de iniciación de la traducción eucariótico 4E1	MR	Receptor de mineralocorticoides
ACTH	Adrenocorticotrofina	mTOR	kinasa TOR blanco de Rapamicina
ACTR	Receptor activado por tiroides y ácido retinoico	mTORC1,2	Complejos mTOR
AD1,2	Dominios de activación transcripcional	NcoA1,2,3	Nuclear Receptor coactivator
ADN	Ácido Desoxirribonucleico	ncoa3	Gene del coactivador de recetores nucleares 3
AF-1,2	Dominio de función de activación 1, 2	NES	Señal de exportación nuclear
AIB1	Amplificada en cáncer de mama 1	NF-κB	Factor Nuclear <i>kappa</i> B
AIF-1	Factor inductor de apoptosis 1	NIK	Dominio de inducción de NF-κB
AKT	Serina / treonina kinasa o PKB	NLS	Señal de Localización Nuclear
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico	nM	Nanomolar
AP-1	Proteína activadora 1	NRs	Receptores nucleares
AR	Receptor de andrógenos	ovx	Ovariectomizado
Arg	Arginina	P/CIP	Proteína asociada y cointegrada a p300/CBP
ARN	Ácido Ribonucleico	p38	p38 kinasa
ARNm	ARN mensajero	PAGE	Electroforesis en Geles de Poliacrilamida
ARNm 50TOP	ARNm con un tramo de oligo-piridina en el extremo 50	PAS	Per/ARNT/Sim
ARNr	ARN ribosomal	pb	Pares de base
ARNt	ARN de transferencia	PBS	Solución Salina de <i>Buffer</i> Fosfato
ATP	Adenosina Trifosfato	p/CAF	p300/CBP-associated factor
βgal	β-galactosidasa	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
BAFF	Factor de activación de células B	PDXP	Pyridoxal fosfatasa
Bak	Proteína pro-apoptótica	PI3K	Fosfatidil-Inositol-3 kinasa
Bax	Proteína pro-apoptótica	PKA	Proteína kinasa A
Bcl	Flia. de proteínas que regulan de la permeabilidad mitocondrial y la vía intrínseca de la apoptosis / Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)	PKC -A	Proteína kinasa C-α
bHLH	Básico de hélice-vuelta-hélice	PM	Peso Molecular
bHLH-PAS	bHLH / dominios homólogos a Per/ARNT/Sim	PP1, 2	Proteínas Fosfatasas
Bim	Proteína pro-apoptótica	PPAR-g	Receptor de proliferación de peroxisoma activado
c-Abl	Homólogo del oncogén viral de leucemia murina de Abelson 1	PR	Receptor de progesterona
CARM-1	Metil transferasa de arginina asociada a coactivadores	PRAS40	Sustrato de Akt rico en Prolina de 40 kDa
CD1	Ciclina D1	PRMT-1,2	Proteína arginina metil-transferasa
Cdk	Kinasa dependiente de Ciclina	protor1/2	Rictor 1 y 2
CMV	Citomegalovirus	PSA	Antígeno prostático específico
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc	PTEN	Proteína/lípido fosfatasa (supresor tumoral)

CTH	Corticotrofina	Puma	Proteína pro-apoptótica
CRM1	Región de mantenimiento cromosómico 1	RAC3	Coactivador asociado a RAR 3
CSF-1	Factor estimulante de colonias 1	RAD001	Rapálogo (análogo de Rapamicina)
DAP1	Proteína asociada a la muerte 1	RANK	Receptor activador de NF- κ B
DBD	Dominio de unión al ADN	Rapa	Rapamicina (inhibidor de mTOR)
DEPTOR	Proteína DEP con dominio de interacción con mTOR	Raptor	Proteína reguladora asociada blanco de Rapamicina de mamíferos
Dex	Dexametasona	RB	Retinoblastoma
DMBA	Dimetilbenzoantraceno	REDD1	Regulador transcripcional de respuesta al daño del ADN 1
DMSO	Dimetilsulfóxido	REGg	Reactivador del proteosoma gamma
DS	Desvío estándar	Rictor	Proteína de mTOR insensible a Rapamicina
E2F	E2 factor de unión al promotor	RID	Dominio de interacción con receptores nucleares
E6-AP	Proteína asociada a la enzima activadora de ubiquitina 6 (E6)	RIP1	Proteína de interacción del receptor 1
ECR	Secuencias evolutivas conservadas evolutivamente	RNAi	ARN de interferencia
EGF	Factor de crecimiento epidérmico	RORα	Receptor nuclear huérfano relacionado al ácido retinoico
eIF4E	Factor de iniciación 4E	rpm	Revoluciones por minuto
ER	Receptor de estrógenos	RT-qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
ERK1/2	Kinasa regulada por señales extracelulares	RU486	Mifepristona
FADD	Proteína Asociada a Fas con Dominio de Muerte	RXR	Ácido trans-retinoico
FCF	Factor de crecimiento de fibroblastos	S6K1	Kinasa 1 S6
FKBP12	Proteína de unión a FK 12	SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Ser	Serina
GCs	Glucocorticoides	SERM	Moduladores selectivos de receptores de estrógeno
GR	Receptor de glucocorticoides	SFB	Suero fetal bovino
GRE	Elemento de respuesta a glucocorticoides	SGK1	Proteína kinasa 1 inducida por suero y glucocorticoides
GRIP1	Proteína de interacción con el receptor de Glucocorticoides 1	SRC-1,2 y 3	Coactivador de Receptores Esteroideos
GSK-3	Kinasa glucógeno sintasa 3	SRF	Factor de respuesta a suero
HAT	Actividad histona acetil transferasa	STAT 6	Activadores de la transcripción y transductores de señales 6
HCT116	Carcinoma colorectal humano	SUMO	Pequeño modificador relacionado a ubiquitina
HEK293	Línea celular no tumoral de riñón embrionario humano	SZ	Sulfazalacina (inhibidor de NF- κ B)

HeLa	Línea celular epitelial humana derivada de cáncer cervical	T47D	Carcinoma ductal humano
HIF -1 a	Factor inducible por hipoxia	T84	Carcinoma colorectal humano
HNF-4	Factor nuclear 4 de hepatocitos	TAD	Dominios de transactivación
HPA	Eje hipotalámico-pituitario-adrenal	TEF	Factor activador transcripcional
Hsp	Proteínas del shock térmico	TEM	Transición epitelio mesenquimática
IAP	Familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis	TFEB	Factor de transcripción EB
IGF-1	Factor de crecimiento insulina- <i>like</i> 1	Thr	Treonina
IκB	Inhibidor de NF-κB	TGF	Factor de crecimiento transformante
IκBss	Inhibidor de NF-κB con una mutación que retiene al factor de transcripción en el citoplasma	TIF2	Factor Intermediario de la Transcripción 2
IKK	Kinasa de IκB	TNF	Factor de Necrosis Tumoral
IL	Interleuquina	TNFR 1, 2	Receptor de TNF
IRS- 1,2	Receptor de insulina	TR	Receptor tiroides
JNK	Kinasa c-Jun N-terminal	TRADD	Proteína con dominio de muerte asociada al TNFR1
K562	Leucemia mieloide crónica (LMC) humana	TRAF2	Factor asociado a TNFR 2
kb	Kilobases	TRAIL	Ligando Inductor de la Apoptosis Relacionado a TNF
KDa	Kilodalton	TRAM-1	Molécula activadora del receptor tiroideo-1
LBD	Dominios de unión al ligando	TRAMP	Modelo de estudio para cáncer prostático en ratones
LKB1	Supresor tumoral /kinasa Serina/treonina 11	Tsc1 / 2	Heterodímero TSC1 (hamartina)/ TSC2 (tuberina)
Lovo	Adenocarcinoma colorectal humano	Tyr	Tirosina
LPS	Lipopolisacarido bacteriano	ug	Microgramo
Luc	Luciferasa	ul	Microlitro
MAPK	Proteína kinasa activada por mitógenos	uM	Micromolar
MCF-7	Línea celular epitelial de cáncer de mama humana	UDR	Unidades densitométricas relativas
MEF-2C	Factor acelerador de miocito-2 C	UFC	Unidades formadoras de colonias
mg	Miligramos	URL	Unidades relativas de luz
min	Minutos	UV	Radiación ultravioleta
ml	Mililitros	VEGF-A	Factor de crecimiento endotelial vascular -A
mM	Milimolar	VEGFR -1-3	Receptores de VEGF
MMP	Metaloproteasas	WIPI2	Ortólogo de Atg18 de mamíferos
MMTV	Promotor del virus de tumor mamario de ratón	Wnt	Vía de señalización que regula la proliferación, polaridad y diferenciación celular

BIBLIOGRAFÍA

1. Onate, S.A., et al., *Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily*. Science, 1995. **270**(5240): p. 1354 -7.
2. Hong, H., et al., *GRIP1, a transcriptional coactivator for the AF-2 transactivation domain of steroid, thyroid, retinoid, and vitamin D receptors*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(5): p. 2735 -44.
3. Voegel, J.J., et al., *The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways*. Embo J, 1998. **17**(2): p. 507 -19.
4. Voegel, J.J., et al., *TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors*. Embo J, 1996. **15**(14): p. 3667 -75.
5. Anzick, S.L., et al., *AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer*. Science, 1997. **277**(5328): p. 965 -8.
6. Gill, G. and M. Ptashne, *Negative effect of the transcriptional activator GAL4*. Nature, 1988. **334**(6184): p. 721 -4.
7. Shang, Y., et al., *Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription*. Cell, 2000. **103**(6): p. 843 -52.
8. Liu, Z., et al., *Sequential recruitment of steroid receptor coactivator-1 (SRC -1) and p300 enhances progesterone receptor-dependent initiation and reinitiation of transcription from chromatin*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(22): p. 12426 -12431.
9. Wu, R.C., et al., *Regulation of SRC-3 (pCIP/ACTR/AIB -1/RAC-3/TRAM-1) Coactivator activity by I kappa B kinase*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(10): p. 3549 -61.
10. Ding, X.F., et al., *Nuclear receptor-binding sites of coactivators glucocorticoid receptor interacting protein 1 (GRIP1) and steroid receptor coactivator 1 (SRC -1): multiple motifs with different binding specificities*. Mol Endocrinol, 1998. **12**(2): p. 302 -13.
11. Nolte, R.T., et al., *Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma*. Nature, 1998. **395**(6698): p. 137 -43.
12. Darimont, B.D., et al., *Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions*. Genes Dev, 1998. **12**(21): p. 3343 -56.
13. Wu, Z., et al., *Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1*. Cell, 1999. **98**(1): p. 115 -24.
14. Yu, C., et al., *An essential function of the SRC-3 coactivator in suppression of cytokine mRNA translation and inflammatory response*. Mol Cell, 2007. **25**(5): p. 765 -78.
15. Lonard, D.M. and B.W. O'Malley, *The expanding cosmos of nuclear receptor coactivators*. Cell, 2006. **125**(3): p. 411-414.
16. Shiau, A.K., et al., *The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen*. Cell, 1998. **95**(7): p. 927 -37.
17. Rangel, J., et al., *Prognostic significance of nuclear receptor coactivator-3 overexpression in primary cutaneous melanoma*. J Clin Oncol, 2006. **24**(28): p. 4565 -9.
18. McKenna, N.J., et al., *Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1999. **69**(1 -6): p. 3 -12.
19. Torchia, J., et al., *The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function*. Nature, 1997. **387**(6634): p. 677 -84.
20. Li, H., P.J. Gomes, and J.D. Chen, *RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(16): p. 8479 -84.
21. Heery, D.M., et al., *A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors*. Nature, 1997. **387**(6634): p. 733 -6.

22. Onate, S.A., et al., *The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors.* J Biol Chem, 1998. **273**(20): p. 12101 -8.
23. Chen, D., et al., *Regulation of transcription by a protein methyltransferase.* Science, 1999. **284**(5423): p. 2174 -7.
24. Koh, S.S., et al., *Synergistic enhancement of nuclear receptor function by p160 coactivators and two coactivators with protein methyltransferase activities.* J Biol Chem, 2001. **276**(2): p. 1089 -98.
25. Sadow, P.M., et al., *Regulation of expression of thyroid hormone receptor isoforms and coactivators in liver and heart by thyroid hormone.* Mol Cell Endocrinol, 2003. **203**(1 -2): p. 65 -75.
26. Spencer, T.E., et al., *Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase.* Nature, 1997. **389**(6647): p. 194-8.
27. Liu, Z., et al., *Sequential recruitment of steroid receptor coactivator-1 (SRC -1) and p300 enhances progesterone receptor-dependent initiation and reinitiation of transcription from chromatin.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(22): p. 12426 -31.
28. Allfrey, V.G., R. Faulkner, and A.E. Mirsky, *Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1964. **51**: p. 786-94.
29. Allfrey, V.G. and A.E. Mirsky, *Structural Modifications of Histones and their Possible Role in the Regulation of RNA Synthesis.* Science, 1964. **144**(3618): p. 559.
30. Chen, H., et al., *Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase.* Cell, 1999. **98**(5): p. 675 -86.
31. Chen, S.L., et al., *The steroid receptor coactivator, GRIP-1, is necessary for MEF-2C-dependent gene expression and skeletal muscle differentiation.* Genes Dev, 2000. **14**(10): p. 1209 -28.
32. Mark, M., et al., *Partially redundant functions of SRC-1 and TIF2 in postnatal survival and male reproduction.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(13): p. 4453 -8.
33. Wang, Z., et al., *Critical roles of the p160 transcriptional coactivators p/CIP and SRC-1 in energy balance.* Cell Metabolism, 2006. **3**(2): p. 111 -122.
34. Xu, J., et al., *Partial hormone resistance in mice with disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC -1) gene.* Science, 1998. **279**(5358): p. 1922 -5.
35. Chen, H., et al., *Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300.* Cell, 1997. **90**(3): p. 569 -80.
36. Takeshita, A., et al., *TRAM-1, A novel 160-kDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1.* J Biol Chem, 1997. **272**(44): p. 276 29-34.
37. Suen, C.S., et al., *A transcriptional coactivator, steroid receptor coactivator-3, selectively augments steroid receptor transcriptional activity.* J Biol Chem, 1998. **273**(42): p. 27645 -53.
38. Xu, J., et al., *The steroid receptor coactivator SRC-3 (p/CIP/RAC3/AIB1/ACTR/TRAM -1) is required for normal growth, puberty, female reproductive function, and mammary gland development.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): p. 6379 -84.
39. Mussi, P., et al., *Stimulation of steroid receptor coactivator-3 (SRC-3) gene overexpression by a positive regulatory loop of E2F1 and SRC-3.* Mol Endocrinol, 2006. **20**(12): p. 3105 -19.
40. Belandia, B. and M.G. Parker, *Functional interaction between the p160 coactivator proteins and the transcriptional enhancer factor family of transcription factors.* J Biol Chem, 2000. **275**(40): p. 30801 -5.
41. Chen, S.L., et al., *Subcellular localization of the steroid receptor coactivators (SRCs) and MEF2 in muscle and rhabdomyosarcoma cells.* Mol Endocrinol, 2001. **15**(5): p. 783 -96.
42. Louie, M.C., et al., *Direct control of cell cycle gene expression by proto-oncogene product ACTR, and its autoregulation underlies its transforming activity.* Mol Cell Biol, 2006. **26**(10): p. 3810 -23.

43. Arimura, A., et al., *The transcriptional co-activator p/CIP (NCoA -3) is up -regulated by STAT6 and serves as a positive regulator of transcriptional activation by STAT6*. J Biol Chem, 2004. **279**(30): p. 31105 -12.
44. Yeung, P.L., A. Zhang, and J.D. Chen, *Nuclear localization of coactivator RAC3 is mediated by a bipartite NLS and importin alpha3*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **348**(1): p. 13 -24.
45. Gojis, O., et al., *The role of SRC-3 in human breast cancer*. Nature Reviews Clinical Oncology, 2010. **7**(2): p. 83-89.
46. Werbajh, S., et al., *RAC-3 is a NF-kappa B coactivator*. FEBS Lett, 2000. **485**(2 -3): p. 195 -9.
47. Yan, J., S.Y. Tsai, and M.J. Tsai, *SRC-3/AIB1: transcriptional coactivator in oncogenesis*. Acta Pharmacol Sin, 2006. **27**(4): p. 387 -94.
48. Qutob, M.S., et al., *Microtubule-dependent subcellular redistribution of the transcriptional coactivator p/CIP*. Molecular and cellular biology, 2002. **22**(18): p. 6611 -6626.
49. Lee, Y.H., H.D. Campbell, and M.R. Stallcup, *Developmentally essential protein flightless I is a nuclear receptor coactivator with actin binding activity*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(5): p. 2103 -17.
50. Li, H. and J.D. Chen, *The receptor-associated coactivator 3 activates transcription through CREB-binding protein recruitment and autoregulation*. J Biol Chem, 1998. **273**(10): p. 5948 -54.
51. Kim, H.J., J.H. Kim, and J.W. Lee, *Steroid receptor coactivator-1 interacts with serum response factor and coactivates serum response element-mediated transactivations*. J Biol Chem, 1998. **273**(44): p. 28564 -7.
52. Yan, J., et al., *Steroid receptor coactivator-3 and activator protein-1 coordinately regulate the transcription of components of the insulin-like growth factor/AKT signaling pathway*. Cancer Res, 2006. **66**(22): p. 11039 -46.
53. Yeung, P.L., A. Zhang, and J.D. Chen, *Nuclear localization of coactivator RAC3 is mediated by a bipartite NLS and importin α 3*. Biochemical and biophysical research communications, 2006. **348**(1): p. 13 -24.
54. Li, C., et al., *Specific amino acid residues in the basic helix-loop-helix domain of SRC-3 are essential for its nuclear localization and proteasome-dependent turnover*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(4): p. 1296 -308.
55. Amazit, L., et al., *Regulation of SRC-3 intercompartmental dynamics by estrogen receptor and phosphorylation*. Molecular and cellular biology, 2007. **27**(19): p. 6913 -6932.
56. Carroll, R.S., et al., *Expression of a subset of steroid receptor cofactors is associated with progesterone receptor expression in meningiomas*. Clinical Cancer Research, 2000. **6**(9): p. 3570 -3575.
57. List, H.J., et al., *Expression of the nuclear coactivator AIB1 in normal and malignant breast tissue*. Breast Cancer Res Treat, 2001. **68**(1): p. 21 -8.
58. Kuang, S.-Q., et al., *AIB1/SRC-3 deficiency affects insulin-like growth factor I signaling pathway and suppresses v-Ha-ras-induced breast cancer initiation and progression in mice*. Cancer research, 2004. **64**(5): p. 1875 -1885.
59. Avivar, Á., et al., *Moderate overexpression of AIB1 triggers pre-neoplastic changes in mammary epithelium*. FEBS Letters, 2006. **580**(22): p. 5222 -5226.
60. Chai, Z., et al., *p38 Mitogen ,activated protein kinase ,dependent regulation of SRC ,3 and involvement in retinoic acid receptor α signaling in embryonic cortical neurons*. IUBMB life, 2009. **61**(6): p. 670 -678.
61. Wu, R.-C., et al., *SRC-3 coactivator functional lifetime is regulated by a phospho-dependent ubiquitin time clock*. Cell, 2007. **129**(6): p. 1125 -1140.
62. Wu, H., et al., *Coordinated regulation of AIB1 transcriptional activity by sumoylation and phosphorylation*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(31): p. 21848 -21856.
63. Naeem, H., et al., *The activity and stability of the transcriptional coactivator p/CIP/SRC-3 are regulated by CARM1-dependent methylation*. Molecular and cellular biology, 2007. **27**(1): p. 120 -134.
64. Zheng, F.F., et al., *Rapid estrogen-induced phosphorylation of the SRC-3 coactivator occurs in an extranuclear complex containing estrogen receptor*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(18): p. 8273 -84.
65. Wu, R.C., et al., *Selective phosphorylations of the SRC-3/AIB1 coactivator integrate genomic responses to multiple cellular signaling pathways*. Mol Cell, 2004. **15**(6): p. 937 -49.

66. Oh, A.S., et al., *Tyrosine phosphorylation of the nuclear receptor coactivator AIB1/SRC-3 is enhanced by Abl kinase and is required for its activity in cancer cells*. Molecular and cellular biology, 2008. **28**(21): p. 6580 -6593.
67. Giamas, G., et al., *CK1 δ modulates the transcriptional activity of ER α via AIB1 in an estrogen-dependent manner and regulates ER α / AIB1 interactions*. Nucleic acids research, 2009. **37**(9): p. 3110 -3123.
68. Yi, P., et al., *Atypical protein kinase C regulates dual pathways for degradation of the oncogenic coactivator SRC-3/AIB1*. Molecular cell, 2008. **29**(4): p. 465 -476.
69. Li, C., et al., *Essential phosphatases and a phospho-degron are critical for regulation of SRC-3/AIB1 coactivator function and turnover*. Molecular cell, 2008. **31**(6): p. 835 -849.
70. Lonard, D.M., et al., *The 26S proteasome is required for estrogen receptor- α and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor- α transactivation*. Molecular cell, 2000. **5**(6): p. 939-948.
71. Li, X., et al., *The SRC-3/AIB1 coactivator is degraded in a ubiquitin-and ATP-independent manner by the REG1 proteasome*. Cell, 2006. **124**(2): p. 381 -392.
72. Han, S.J., D.M. Lonard, and B.W. O' Malley, *Multi-modulation of nuclear receptor coactivators through posttranslational modifications*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2009. **20**(1): p. 8 -15.
73. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Shared principles in NF- κ B signaling*. Cell, 2008. **132**(3): p. 344 -362.
74. Perkins, N. and T. Gilmore, *Good cop, bad cop: the different faces of NF- κ B*. Cell Death & Differentiation, 2006. **13**(5): p. 759 -772.
75. Bakkar, N. and D.C. Guttridge, *NF- κ B signaling: a tale of two pathways in skeletal myogenesis*. Physiological reviews, 2010. **90**(2): p. 495 -511.
76. Osborn, L., S. Kunkel, and G.J. Nabel, *Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(7): p. 2336 -40.
77. SHEN, B.-J., et al., *Transcriptional induction of the *agg/ebp* α /*ebp* β gene by hepatocyte growth factor*. DNA and cell biology, 1997. **16**(6): p. 703 -711.
78. Wood, J., *Regulation of NF- κ B activity in rat dorsal root ganglia and PC12 cells by tumour necrosis factor and nerve growth factor*. Neuroscience letters, 1995. **192**(1): p. 41 -44.
79. Bertrand, F., et al., *Insulin activates nuclear factor κ B in mammalian cells through a Raf-1-mediated pathway*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(41): p. 24435 -24441.
80. Schreck, R., P. Rieber, and P.A. Baeuerle, *Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1*. The EMBO journal, 1991. **10**(8): p. 2247.
81. Elizabeth, B., *NF- κ B and Rel proteins in innate immunity*. Advances in immunology, 1995. **58**: p. 1.
82. Huxford, T., et al., *The crystal structure of the IkappaBalpha/NF-kappaB complex reveals mechanisms of NF-kappaB inactivation*. Cell, 1998. **95**(6): p. 759 -70.
83. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Signaling to NF-kappaB*. Genes Dev, 2004. **18**(18): p. 2195 -224.
84. Traenckner, E.B., et al., *Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli*. Embo J, 1995. **14**(12): p. 2876 -83.
85. Yamamoto, Y., et al., *Histone H3 phosphorylation by IKK-alpha is critical for cytokine-induced gene expression*. Nature, 2003. **423**(6940): p. 655 -9.
86. Kwak, Y.T., et al., *IkappaB kinase alpha regulates subcellular distribution and turnover of cyclin D1 by phosphorylation*. J Biol Chem, 2005. **280**(40): p. 33945 -52.
87. Lawrence, T., et al., *IKKalpha limits macrophage NF-kappaB activation and contributes to the resolution of inflammation*. Nature, 2005. **434**(7037): p. 1138 -43.
88. Xiao, W., *Advances in NF-kappaB signaling transduction and transcription*. Cell Mol Immunol, 2004. **1**(6): p. 425-35.
89. Arenzana-Seisdedos, F., et al., *Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm*. J Cell Sci, 1997. **110 (Pt 3)** : p. 369-78.

90. Heissmeyer, V., et al., *NF-kappaB p105 is a target of IkappaB kinases and controls signal induction of Bcl-3-p50 complexes*. Embo J, 1999. **18**(17): p. 4766 -78.
91. Cohen, S., H. Achbert-Weiner, and A. Ciechanover, *Dual effects of IkappaB kinase beta-mediated phosphorylation on p105 Fate: SCF(beta -TrCP) -dependent degradation and SCF(beta -TrCP) -independent processing*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(1): p. 475 -86.
92. Hoesel, B. and J.A. Schmid, *The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer*. Mol Cancer, 2013. **12**(86.10): p. 1186.
93. Sheppard, K.A., et al., *Transcriptional activation by NF-kappaB requires multiple coactivators*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(9): p. 6367 -78.
94. Na, S.Y., et al., *Steroid receptor coactivator-1 interacts with the p50 subunit and coactivates nuclear factor kappaB-mediated transactivations*. J Biol Chem, 1998. **273**(18): p. 10831 -4.
95. Gerritsen, M.E., et al., *CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(7): p. 2927 -32.
96. DiDonato, J.A., et al., *A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB*. Nature, 1997. **388**(6642): p. 548 -54.
97. Chen, L.F., Y. Mu, and W.C. Greene, *Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB*. Embo J, 2002. **21**(23): p. 6539 -48.
98. Hu, J. and N.H. Colburn, *Histone deacetylase inhibition down-regulates cyclin D1 transcription by inhibiting nuclear factor-kappaB/p65 DNA binding*. Mol Cancer Res, 2005. **3**(2): p. 100 -9.
99. Israel, A., *The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-kappaB?* Trends Cell Biol, 2000. **10**(4): p. 129-33.
100. Sethi, G., B. Sung, and B.B. Aggarwal, *Nuclear factor-kB activation: from bench to bedside*. Experimental Biology and Medicine, 2008. **233**(1): p. 21 -31.
101. Aggarwal, B.B., S.C. Gupta, and J.H. Kim, *Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey*. Blood, 2012. **119**(3): p. 651 -665.
102. Beg, A.A. and D. Baltimore, *An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death*. Science, 1996. **274**(5288): p. 782 -4.
103. Wang, C.Y., M.W. Mayo, and A.S. Baldwin, Jr., *TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB*. Science, 1996. **274**(5288): p. 784 -7.
104. Ware, C., et al., *Tumor necrosis factor (TNF) receptor expression in T lymphocytes. Differential regulation of the type I TNF receptor during activation of resting and effector T cells*. The Journal of Immunology, 1991. **147**(12): p. 4229-4238.
105. Annunziato, F., et al., *Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4+ CD25+ human thymocytes*. The Journal of experimental medicine, 2002. **196**(3): p. 379 -387.
106. Arnett, H.A., et al., *TNFA promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination*. Nature neuroscience, 2001. **4**(11): p. 1116 -1122.
107. Dopp, J.M., et al., *Expression of the p75 TNF receptor is linked to TNF-induced NFkB translocation and oxyradical neutralization in glial cells*. Neurochemical research, 2002. **27**(11): p. 1535 -1542.
108. Böcker, W., et al., *IKK-2 is required for TNF-alpha-induced invasion and proliferation of human mesenchymal stem cells*. Journal of Molecular Medicine, 2008. **86**(10): p. 1183 -1192.
109. Tartaglia, L.A. and D.V. Goeddel, *Two TNF receptors*. Immunol Today, 1992. **13**(5): p. 151 -3.
110. Orlinick, J.R. and M.V. Chao, *TNF-related ligands and their receptors*. Cell Signal, 1998. **10**(8): p. 543 -51.
111. Baker, S.J. and E.P. Reddy, *Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily*. Oncogene, 1998. **17**(25): p. 3261 -70.
112. Hsu, H., J. Xiong, and D.V. Goeddel, *The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation*. Cell, 1995. **81**(4): p. 495 -504.

113. Rothe, M., et al., *TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40*. Science, 1995. **269**(5229): p. 1424 -7.
114. Liu, Z.G., et al., *Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death*. Cell, 1996. **87**(3): p. 565 -76.
115. Fotin-Mleczek, M., et al., *Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 13): p. 2757 -70.
116. Chu, W.-M., *Tumor necrosis factor*. Cancer letters, 2013. **328**(2): p. 222 -225.
117. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): p. 783 -801.
118. Polito, A.J. and D. Proud, *Epithelial cells as regulators of airway inflammation*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1998. **102**(5): p. 714 -718.
119. Ritchlin, C., *Fibroblast biology. Effector signals released by the synovial fibroblast in arthritis*. Arthritis Res, 2000. **2**(5): p. 356 -360.
120. Moresco, E.M.Y., D. LaVine, and B. Beutler, *Toll-like receptors*. Current biology, 2011. **21**(13): p. R488 -R493.
121. Chinenov, Y. and I. Rogatsky, *Glucocorticoids and the innate immune system: crosstalk with the toll-like receptor signaling network*. Molecular and cellular endocrinology, 2007. **275**(1): p. 30 -42.
122. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Regulation of adaptive immunity by the innate immune system*. Science, 2010. **327**(5963): p. 291 -295.
123. Barnes, P.J., K.F. Chung, and C.P. Page, *Inflammatory mediators of asthma: an update*. Pharmacological reviews, 1998. **50**(4): p. 515 -596.
124. Hu, X. and L.B. Ivashkiv, *Cross-regulation of signaling pathways by interferon-γ: implications for immune responses and autoimmune diseases*. Immunity, 2009. **31**(4): p. 539 -550.
125. Louet, J.-F., et al., *Oncogenic steroid receptor coactivator-3 is a key regulator of the white adipogenic program*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(47): p. 17868 -17873.
126. Chen, Q., et al., *Steroid receptor coactivator 3 is required for clearing bacteria and repressing inflammatory response in Escherichia coli-induced septic peritonitis*. The Journal of Immunology, 2010. **185**(9): p. 5444 -5452.
127. Li, J., et al., *Steroid receptor coactivator-3 differentially regulates the inflammatory response in peritoneal macrophages*. Molecular medicine reports, 2012. **5**(4): p. 1099.
128. Li, J., et al., *Effects of SCR-3 on the immunosuppression accompanied with the systemic inflammatory response syndrome*. Molecular and cellular biochemistry, 2012. **364**(1 -2): p. 29 -37.
129. Grose, R., et al., *A role for endogenous glucocorticoids in wound repair*. EMBO reports, 2002. **3**(6): p. 575 -582.
130. Flanagan-Cato, L.M. and S.J. Fluharty, *Emerging mechanisms of the behavioral effects of steroids*. Current opinion in neurobiology, 1997. **7**(6): p. 844 -848.
131. Baschant, U. and J. Tuckermann, *The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity*. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 2010. **120**(2): p. 69 -75.
132. Brewer, J.A., et al., *T-cell glucocorticoid receptor is required to suppress COX-2-mediated lethal immune activation*. Nature medicine, 2003. **9**(10): p. 1318 -1322.
133. Wüst, S., et al., *Peripheral T cells are the therapeutic targets of glucocorticoids in experimental autoimmune encephalomyelitis*. The Journal of Immunology, 2008. **180**(12): p. 8434 -8443.
134. Barnes, P.J., *Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms*. Clinical Science, 1998. **94**(6): p. 557 -572.
135. Sapolsky, R.M., L.M. Romero, and A.U. Munck, *How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions 1*. Endocrine reviews, 2000. **21**(1): p. 55 -89.
136. Chrousos, G.P. and T. Kino, *Intracellular glucocorticoid signaling: a formerly simple system turns stochastic*. Science Signaling, 2005. **2005**(304): p. pe48.

137. Smith, S.M. and W.W. Vale, *The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress*. Dialogues in clinical neuroscience, 2006. **8**(4): p. 383.
138. Smoak, K. and J.A. Cidlowski, *Glucocorticoids regulate tristetraprolin synthesis and posttranscriptionally regulate tumor necrosis factor alpha inflammatory signaling*. Molecular and cellular biology, 2006. **26**(23): p. 9126 -9135.
139. Galon, J., et al., *Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells*. The FASEB journal, 2002. **16**(1): p. 61 -71.
140. Medzhitov, R. and T. Horng, *Transcriptional control of the inflammatory response*. Nature Reviews Immunology, 2009. **9**(10): p. 692 -703.
141. Marcilhac, A., et al., *Effects of bilateral olfactory bulbectomy on circadian rhythms of ACTH, corticosterone, motor activity and body temperature in male rats*. Archives of physiology and biochemistry, 1997. **105**(6): p. 552 -559.
142. Franchimont, D., et al., *Glucocorticoids and inflammation revisited: the state of the art*. Neuroimmunomodulation, 2003. **10**(5): p. 247 -260.
143. Glaser, R. and J.K. Kiecolt-Glaser, *Stress-induced immune dysfunction: implications for health*. Nature Reviews Immunology, 2005. **5**(3): p. 243 -251.
144. Robinson-Rechavi, M., et al., *How many nuclear hormone receptors are there in the human genome?* TRENDS in Genetics, 2001. **17**(10): p. 554 -556.
145. Breslin, M.B., C.-D. Geng, and W.V. Vedeckis, *Multiple promoters exist in the human GR gene, one of which is activated by glucocorticoids*. Molecular Endocrinology, 2001. **15**(8): p. 1381 -1395.
146. Lu, N.Z. and J.A. Cidlowski, *Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes*. Molecular cell, 2005. **18**(3): p. 331 -342.
147. Hollenberg, S.M., et al., *Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA*. Nature, 1984. **318**(6047): p. 635 -641.
148. Schoenmakers, E., et al., *Differences in DNA binding characteristics of the androgen and glucocorticoid receptors can determine hormone-specific responses*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(16): p. 12290 -12297.
149. Liden, J., et al., *A new function for the C-terminal zinc finger of the glucocorticoid receptor repression of RelA transactivation*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(34): p. 21467 -21472.
150. Moras, D. and H. Gronemeyer, *The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function*. Current opinion in cell biology, 1998. **10**(3): p. 384 -391.
151. Meijsing, S.H., et al., *DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity*. Science, 2009. **324**(5925): p. 407 -410.
152. Picard, D. and K.R. Yamamoto, *Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor*. The EMBO journal, 1987. **6**(11): p. 3333.
153. Pratt, W.B. and D.O. Toft, *Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones 1*. Endocrine reviews, 1997. **18**(3): p. 306-360.
154. Davies, T.H., Y.-M. Ning, and E.R. Sánchez, *A New First Step in Activation of Steroid Receptors HORMONE-INDUCED SWITCHING OF FKBP51 AND FKBP52 IMMUNOPHILINS*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(7): p. 4597 -4600.
155. Haller, J., É. Mikics, and G.B. Makara, *The effects of non-genomic glucocorticoid mechanisms on bodily functions and the central neural system. A critical evaluation of findings*. Frontiers in neuroendocrinology, 2008. **29**(2): p. 273-291.
156. Freedman, N.D. and K.R. Yamamoto, *Importin 7 and importin α /importin β are nuclear import receptors for the glucocorticoid receptor*. Molecular biology of the cell, 2004. **15**(5): p. 2276 -2286.
157. Carrigan, A., et al., *An active nuclear retention signal in the glucocorticoid receptor functions as a strong inducer of transcriptional activation*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(15): p. 10963 -10971.
158. FREEDMAN, L.P., *Anatomy of the steroid receptor zinc finger region*. Endocrine reviews, 1992. **13**(2): p. 129 -145.

159. Ronacher, K., et al., *Ligand-selective transactivation and transrepression via the glucocorticoid receptor: role of cofactor interaction*. Molecular and cellular endocrinology, 2009. **299**(2): p. 219 -231.
160. Abraham, R.T. and G.J. Wiederrecht, *Immunopharmacology of rapamycin*. Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 483-510.
161. Stavreva, D.A., et al., *Rapid glucocorticoid receptor exchange at a promoter is coupled to transcription and regulated by chaperones and proteasomes*. Molecular and cellular biology, 2004. **24**(7): p. 2682 -2697.
162. Okret, S., et al., *Down-regulation of glucocorticoid receptor mRNA by glucocorticoid hormones and recognition by the receptor of a specific binding sequence within a receptor cDNA clone*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1986. **83**(1 6): p. 5899 -5903.
163. Vedeckis, W.V., M. Ali, and H.R. Allen, *Regulation of glucocorticoid receptor protein and mRNA levels*. Cancer research, 1989. **49**(8 Supplement): p. 2295s -2302s.
164. Liberman, A.C., et al., *Glucocorticoids inhibit GATA-3 phosphorylation and activity in T cells*. The FASEB journal, 2009. **23**(5): p. 1558 -1571.
165. Kassel, O. and P. Herrlich, *Crosstalk between the glucocorticoid receptor and other transcription factors: molecular aspects*. Molecular and cellular endocrinology, 2007. **275**(1): p. 13-29.
166. Johnson, G.L. and R. Lapadat, *Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases*. Science, 2002. **298**(5600): p. 1911 -1912.
167. Schüle, R., et al., *Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor*. Cell, 1990. **62**(6): p. 1217 -1226.
168. Oakley, R.H. and J.A. Cidlowski, *Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(5): p. 3177 -3184.
169. Ray, A. and K.E. Prefontaine, *Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994. **91**(2): p. 752 -756.
170. Scheinman, R.I., et al., *Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors*. Molecular and cellular biology, 1995. **15**(2): p. 943 -953.
171. Adcock, I.M., et al., *Ligand induced differentiation of glucocorticoid receptor (GR) trans repression and transactivation: preferential targetting of NF kappa B and lack of I kappa B involvement*. British journal of pharmacology, 1999. **127**(4): p. 1003 -1011.
172. Vezina, C., A. Kudelski, and S.N. Sehgal, *Rapamycin (AY -22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle*. J Antibiot (Tokyo), 1975. **28**(10): p. 721 -6.
173. Ray, P., et al., *Repression of interleukin-6 gene expression by 17 [beta]-estradiol:: inhibition of the DNA-binding activity of the transcription factors NF-IL6 and NF-[kappa] B by the estrogen receptor*. FEBS Letters, 1997. **409**(1): p. 79 -85.
174. Yang-Yen, H.-F., et al., *Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction*. Cell, 1990. **62**(6): p. 1205 -1215.
175. De Bosscher, K., et al., *Glucocorticoids repress NF-kB-driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**(8): p. 3919 -3924.
176. Ogawa, S., et al., *Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors*. Cell, 2005. **122**(5): p. 707 -721.
177. Reily, M.M., et al., *The GRIP1: IRF3 interaction as a target for glucocorticoid receptor mediated immunosuppression*. The EMBO journal, 2006. **25**(1): p. 108 -117.
178. Chinenov, Y., et al., *Role of transcriptional coregulator GRIP1 in the anti-inflammatory actions of glucocorticoids*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(29): p. 11776 -11781.

179. McCoy, C.E., et al., *Glucocorticoids inhibit IRF3 phosphorylation in response to Toll-like receptor-3 and-4 by targeting TBK1 activation*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(21): p. 14277 -14285.
180. Horwitz, K., et al., *Nuclear receptor coactivators and corepressors*. Molecular Endocrinology (baltimore, md.), 1996. **10**(10): p. 1167 -1177.
181. York, B. and B.W. O'Malley, *Steroid receptor coactivator (SRC) family: masters of systems biology*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(50): p. 38743 -38750.
182. McKay, L.I. and J.A. Cidlowski, *CBP (CREB binding protein) integrates NF- κ B and nuclear factor- κ B and glucocorticoid receptor physical interactions and antagonism*. Molecular Endocrinology, 2000. **14**(8): p. 1222 -1234.
183. Lee, S.-K., et al., *Steroid receptor coactivator-1 coactivates activating protein-1-mediated transactivations through interaction with the c-Jun and c-Fos subunits*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(27): p. 16651 -16654.
184. Sheppard, K.-A., et al., *Nuclear integration of glucocorticoid receptor and nuclear factor- κ B signaling by CREB-binding protein and steroid receptor coactivator-1*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(45): p. 29291 -29294.
185. Costas, M.A., et al., *Transrepression of NF-kappaB is not required for glucocorticoid-mediated protection of TNF-alpha-induced apoptosis on fibroblasts*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1499**(1-2): p. 122 -129.
186. De Bosscher, K., W. Vanden Berghe, and G. Haegeman, *The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor- κ B or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression*. Endocrine reviews, 2003. **24**(4): p. 488 -522.
187. Auphan, N., et al., *Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis*. Science, 1995. **270**(5234): p. 286 -290.
188. Clark, A.R., *Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes*. Molecular and cellular endocrinology, 2007. **275**(1): p. 79 -97.
189. Scheinman, R.I., et al., *Role of transcriptional activation of I κ B α in mediation of immunosuppression by glucocorticoids*. Science, 1995. **270**(5234): p. 283 -286.
190. Aggarwal, B.B., R. Vijayalekshmi, and B. Sung, *Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe*. Clinical Cancer Research, 2009. **15**(2): p. 425 -430.
191. Young, E.A., J. Abelson, and S.L. Lightman, *Cortisol pulsatility and its role in stress regulation and health*. Frontiers in neuroendocrinology, 2004. **25**(2): p. 69 -76.
192. Windle, R., et al., *The Pulsatile Characteristics of Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Activity in Female Lewis and Fischer 344 Rats and Its Relationship to Differential Stress Responses 1*. Endocrinology, 1998. **139**(10): p. 4044-4052.
193. Meyer, T., J. Carlstedt-Duke, and D.B. Starr, *A weak TATA box is a prerequisite for glucocorticoid-dependent repression of the osteocalcin gene*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(49): p. 30709 -30714.
194. Grivennikov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin, *Immunity, inflammation, and cancer*. Cell, 2010. **140**(6): p. 883 -899.
195. Verhaak, R.G., et al., *Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1*. Cancer Cell, 2010. **17**(1): p. 98 -110.
196. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.
197. Bindea, G., et al., *Natural immunity to cancer in humans*. Current opinion in immunology, 2010. **22**(2): p. 215 -222.
198. Pages, F., et al., *Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored*. Oncogene, 2010. **29**(8): p. 1093 -1102.
199. Vajdic, C.M. and M.T. van Leeuwen, *Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation*. International journal of cancer, 2009. **125**(8): p. 1747 -1754.

200. Yang, L., Y. Pang, and H.L. Moses, *TGF- β and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression*. Trends in immunology, 2010. **31**(6): p. 220 -227.
201. Shields, J.D., et al., *Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21*. Science, 2010. **328**(5979): p. 749 -752.
202. Mougiakakos, D., et al., *Regulatory T cells in cancer*. Advances in cancer research, 2010. **107**: p. 57-117.
203. Ostrand-Rosenberg, S. and P. Sinha, *Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer*. The Journal of Immunology, 2009. **182**(8): p. 4499 -4506.
204. Kim, R., M. Emi, and K. Tanabe, *Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape*. Immunology, 2007. **121**(1): p. 1 -14.
205. Strauss, D.C. and J.M. Thomas, *Transmission of donor melanoma by organ transplantation*. The lancet oncology, 2010. **11**(8): p. 790 -796.
206. DeNardo, D.G., P. Andreu, and L.M. Coussens, *Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity*. Cancer and Metastasis Reviews, 2010. **29**(2): p. 309 -316.
207. Colotta, F., et al., *Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability*. Carcinogenesis, 2009. **30**(7): p. 1073 -1081.
208. Qian, B.-Z. and J.W. Pollard, *Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis*. Cell, 2010. **141**(1): p. 39 -51.
209. de Visser, K.E., A. Eichten, and L.M. Coussens, *Paradoxical roles of the immune system during cancer development*. Nature Reviews Cancer, 2006. **6**(1): p. 24 -37.
210. Kessenbrock, K., V. Plaks, and Z. Werb, *Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment*. Cell, 2010. **141**(1): p. 52 -67.
211. Gocheva, V., et al., *IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion*. Genes & development, 2010. **24**(3): p. 241 -255.
212. Wyckoff, J.B., et al., *Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors*. Cancer research, 2007. **67**(6): p. 2649 -2656.
213. Shishodia, S. and B.B. Aggarwal, *Guggulsterone inhibits NF- κ B and I κ B α kinase activation, suppresses expression of anti-apoptotic gene products, and enhances apoptosis*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(45): p. 47148 -47158.
214. Johnston, D.A., B. Dong, and C.C. Hughes, *TNF induction of jagged-1 in endothelial cells is NF κ B-dependent*. Gene, 2009. **435**(1): p. 36 -44.
215. Kulbe, H., et al., *The inflammatory cytokine tumor necrosis factor- α regulates chemokine receptor expression on ovarian cancer cells*. Cancer research, 2005. **65**(22): p. 10355 -10362.
216. Stathopoulos, G.T., et al., *Host nuclear factor- κ B activation potentiates lung cancer metastasis*. Molecular Cancer Research, 2008. **6**(3): p. 364 -371.
217. Mukhopadhyay, T., J.A. Roth, and S.A. Maxwell, *Altered expression of the p50 subunit of the NF-kappa B transcription factor complex in non-small cell lung carcinoma*. Oncogene, 1995. **11**(5): p. 999 -1003.
218. Gilmore, T.D., et al., *Rel/NF-kappaB/IkappaB proteins and cancer*. Oncogene, 1996. **13**(7): p. 1367 -78.
219. Bargou, R.C., et al., *High-level nuclear NF-kappa B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells*. Blood, 1996. **87**(10): p. 4340 -7.
220. Devalaraja, M.N., et al., *Elevated constitutive IkappaB kinase activity and IkappaB-alpha phosphorylation in Hs294T melanoma cells lead to increased basal MGSA/GRO-alpha transcription*. Cancer Res, 1999. **59**(6): p. 1372-7.
221. Dejardin, E., et al., *Regulation of NF-kappaB activity by I kappaB-related proteins in adenocarcinoma cells*. Oncogene, 1999. **18**(16): p. 2567 -77.
222. Sumitomo, M., et al., *Induction of apoptosis of cytokine-producing bladder cancer cells by adenovirus-mediated IkappaBalpha overexpression*. Hum Gene Ther, 1999. **10**(1): p. 37 -47.

223. Bassères, D.S., et al., *Requirement of the NF- κ B Subunit p65/RelA for K-Ras γ Induced Lung Tumorigenesis*. Cancer research, 2010. **70**(9): p. 3537 -3546.
224. Tang, X., et al., *Nuclear factor κ B γ nf κ B γ is frequently expressed in lung cancer and preneoplastic lesions*. Cancer, 2006. **107**(11): p. 2637 -2646.
225. Sovak, M.A., et al., *Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer*. J Clin Invest, 1997. **100**(12): p. 2952 -60.
226. Chaturvedi, M., et al., *NF- κ B addiction and its role in cancer: 'one size does not fit all'*. Oncogene, 2011. **30**(14): p. 1615 -1630.
227. Rubio, M.F., et al., *TNF-alpha enhances estrogen-induced cell proliferation of estrogen-dependent breast tumor cells through a complex containing nuclear factor-kappa B*. Oncogene, 2006. **25**(9): p. 1367 -77.
228. Colo, G.P., et al., *The p160 nuclear receptor co-activator RAC3 exerts an anti-apoptotic role through a cytoplasmic action*. Oncogene, 2008. **27**(17): p. 2430 -44.
229. Torres-Arzuayus, M.I., et al., *High tumor incidence and activation of the PI3K/AKT pathway in transgenic mice define AIB1 as an oncogene*. Cancer Cell, 2004. **6**(3): p. 26 3-74.
230. Torres-Arzuayus, M.I., et al., *Estrogen-dependent and estrogen-independent mechanisms contribute to AIB1-mediated tumor formation*. Cancer research, 2010. **70**(10): p. 4102 -4111.
231. Bouras, T., M.C. Southey, and D.J. Venter, *Overexpression of the steroid receptor coactivator AIB1 in breast cancer correlates with the absence of estrogen and progesterone receptors and positivity for p53 and HER2/neu*. Cancer Res, 2001. **61**(3): p. 903 -7.
232. Kuang, S.Q., et al., *Mice lacking the amplified in breast cancer 1/steroid receptor coactivator-3 are resistant to chemical carcinogen-induced mammary tumorigenesis*. Cancer Res, 2005. **65**(17): p. 7993 -8002.
233. Bautista, S., et al., *In breast cancer, amplification of the steroid receptor coactivator gene AIB1 is correlated with estrogen and progesterone receptor positivity*. Clin Cancer Res, 1998. **4**(12): p. 2925 -9.
234. Glaeser, M., et al., *Gene amplification and expression of the steroid receptor coactivator SRC3 (AIB1) in sporadic breast and endometrial carcinomas*. Horm Metab Res, 2001. **33**(3): p. 121 -6.
235. Iwase, H., et al., *Clinical significance of AIB1 expression in human breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2003. **80**(3): p. 339 -45.
236. Kirkegaard, T., et al., *Amplified in breast cancer 1 in human epidermal growth factor receptor γ positive tumors of tamoxifen-treated breast cancer patients*. Clinical Cancer Research, 2007. **13**(5): p. 1405 -1411.
237. Thorat, M., et al., *Amplified in breast cancer 1 expression in breast cancer*. Histopathology, 2008. **53**(6): p. 634 -641.
238. Zhao, C., et al., *Elevated expression levels of NCOA3, TOP1, and TFAP2C in breast tumors as predictors of poor prognosis*. Cancer, 2003. **98**(1): p. 18 -23.
239. Hudelist, G., et al., *Expression of sex steroid receptors and their co-factors in normal and malignant breast tissue: AIB1 is a carcinoma-specific co-activator*. Breast cancer research and treatment, 2003. **78**(2): p. 193 -204.
240. Alkner, S., et al., *AIB1 is a predictive factor for tamoxifen response in premenopausal women*. Annals of oncology, 2010. **21**(2): p. 238 -244.
241. Osborne, C.K., et al., *Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC -3) and HER -2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(5): p. 353 -61.
242. Fereshteh, M.P., et al., *The nuclear receptor coactivator amplified in breast cancer-1 is required for Neu (ErbB2/HER2) activation, signaling, and mammary tumorigenesis in mice*. Cancer research, 2008. **68**(10): p. 3697-3706.
243. Qin, L., et al., *The AIB1 oncogene promotes breast cancer metastasis by activation of PEA3-mediated matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 expression*. Molecular and cellular biology, 2008. **28**(19): p. 5937 -5950.

244. Harigopal, M., et al., *Estrogen receptor co-activator (AIB1) protein expression by automated quantitative analysis (AQUA) in a breast cancer tissue microarray and association with patient outcome*. Breast cancer research and treatment, 2009. **115**(1): p. 77 -85.
245. Gnanapragasam, V.J., et al., *Expression of RAC 3, a steroid hormone receptor co-activator in prostate cancer*. Br J Cancer, 2001. **85**(12): p. 1928 -36.
246. Zhou, H.J., et al., *SRC-3 is required for prostate cancer cell proliferation and survival*. Cancer Res, 2005. **65**(17): p. 7976 -83.
247. Zhou, G., et al., *Role of the steroid receptor coactivator SRC-3 in cell growth*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(21): p. 7742-55.
248. Hurwitz, A.A., et al., *The TRAMP mouse as a model for prostate cancer*. Current protocols in immunology, 2001: p. 20.5. 1-20.5. 23.
249. Chung, A.C., et al., *Genetic ablation of the amplified-in-breast cancer 1 inhibits spontaneous prostate cancer progression in mice*. Cancer research, 2007. **67**(12): p. 5965 -5975.
250. Tanner, M.M., et al., *Frequent amplification of chromosomal region 20q12-q13 in ovarian cancer*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(5): p. 1833 -9.
251. Yoshida, H., et al., *Steroid receptor coactivator-3, a homolog of Taiman that controls cell migration in the *Drosophila* ovary, regulates migration of human ovarian cancer cells*. Molecular and cellular endocrinology, 2005. **245**(1): p. 77 -85.
252. Sakaguchi, H., et al., *Clinical implications of steroid receptor coactivator (SRC) -3 in uterine endometrial cancers*. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 2007. **104**(3): p. 237 -240.
253. Ma, G., et al., *SRC-3 has a role in cancer other than as a nuclear receptor coactivator*. International journal of biological sciences, 2011. **7**(5): p. 664.
254. Henke, R.T., et al., *Overexpression of the nuclear receptor coactivator AIB1 (SRC -3) during progression of pancreatic adenocarcinoma*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(18 Pt 1): p. 6134 -42.
255. Ghadimi, B.M., et al., *Specific chromosomal aberrations and amplification of the AIB1 nuclear receptor coactivator gene in pancreatic carcinomas*. Am J Pathol, 1999. **154**(2): p. 525 -36.
256. Xu, F.P., et al., *SRC-3/AIB1 protein and gene amplification levels in human esophageal squamous cell carcinomas*. Cancer Lett, 2007. **245**(1 -2): p. 69 -74.
257. Cai, D., et al., *Steroid Receptor Coactivator-3 Expression in Lung Cancer and Its Role in the Regulation of Cancer Cell Survival and Proliferation*. Cancer Res.
258. Sakakura, C., et al., *Amplification and over-expression of the AIB1 nuclear receptor co-activator gene in primary gastric cancers*. Int J Cancer, 2000. **89**(3): p. 217 -23.
259. Xie, D., et al., *Correlation of AIB1 overexpression with advanced clinical stage of human colorectal carcinoma*. Hum Pathol, 2005. **36**(7): p. 777 -83.
260. Luo, J.H., et al., *Protein expression and amplification of AIB1 in human urothelial carcinoma of the bladder and overexpression of AIB1 is a new independent prognostic marker of patient survival*. Int J Cancer, 2008. **122**(11): p. 2554-61.
261. Wang, Y., et al., *Prognostic significance of c-myc and AIB1 amplification in hepatocellular carcinoma. A broad survey using high-throughput tissue microarray*. Cancer, 2002. **95**(11): p. 2346 -52.
262. Lauritsen, K.J., et al., *A role for TGF-beta in estrogen and retinoid mediated regulation of the nuclear receptor coactivator AIB1 in MCF-7 breast cancer cells*. Oncogene, 2002. **21**(47): p. 7147 -7155.
263. Lonard, D.M., S.Y. Tsai, and B.W. O'Malley, *Selective estrogen receptor modulators 4-hydroxytamoxifen and raloxifene impact the stability and function of SRC-1 and SRC-3 coactivator proteins*. Molecular and cellular biology, 2004. **24**(1): p. 14 -24.
264. Schroder, A.J., et al., *Cutting edge: STAT6 serves as a positive and negative regulator of gene expression in IL-4-stimulated B lymphocytes*. The Journal of Immunology, 2002. **168**(3): p. 996 -1000.

265. Arimura, A., et al., *The transcriptional co-activator p/CIP (NCoA -3) is up-regulated by STAT6 and serves as a positive regulator of transcriptional activation by STAT6*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(30): p. 31105-31112.
266. Hsia, E.Y., et al., *Deregulated E2F and the AAA+ coregulator ANCCA drive proto-oncogene ACTR/AIB1 overexpression in breast cancer*. Molecular Cancer Research, 2010. **8**(2): p. 183 -193.
267. Hossain, A., M.T. Kuo, and G.F. Saunders, *Mir-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA*. Molecular and cellular biology, 2006. **26**(21): p. 8191 -8201.
268. Mani, A., et al., *E6AP mediates regulated proteasomal degradation of the nuclear receptor coactivator amplified in breast cancer 1 in immortalized cells*. Cancer research, 2006. **66**(17): p. 8680 -8686.
269. Kajiro, M., et al., *The ubiquitin ligase CHIP acts as an upstream regulator of oncogenic pathways*. Nature cell biology, 2009. **11**(3): p. 312 -319.
270. De Bosscher, K. and G. Haegeman, *Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids*. Molecular Endocrinology, 2009. **23**(3): p. 281 -291.
271. Löwenberg, M., et al., *Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression*. Trends in molecular medicine, 2007. **13**(4): p. 158 -163.
272. Reiter, R., et al., *Impact of the nuclear receptor coactivator AIB1 isoform AIB1-Delta3 on estrogenic ligands with different intrinsic activity*. Oncogene, 2004. **23**(2): p. 403 -9.
273. Rubio, M.F., et al., *Cyclin D1 is a NF- κ B corepressor*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Molecular Cell Research, 2012. **1823**(6): p. 1119 -1131.
274. Elledge, S.J., *Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis*. Science, 1996. **274**(5293): p. 1664 -1672.
275. Pavletich, N.P., *Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of cdks, their cyclin activators, and cip and INK4 inhibitors*. Journal of molecular biology, 1999. **287**(5): p. 821 -828.
276. Canepa, E.T., et al., *INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions*. IUBMB life, 2007. **59**(7): p. 419 -426.
277. Weinberg, R.A., *The retinoblastoma protein and cell cycle control*. Cell, 1995. **81**(3): p. 323 -330.
278. Vogelstein, B., D. Lane, and A.J. Levine, *Surfing the p53 network*. Nature, 2000. **408**(6810): p. 307 -310.
279. Xu, Y., et al., *Overexpression of transcriptional coactivator AIB1 promotes hepatocellular carcinoma progression by enhancing cell proliferation and invasiveness*. Oncogene, 2010. **29**(23): p. 3386 -3397.
280. Louie, M.C., et al., *ACTR/AIB1 functions as an E2F1 coactivator to promote breast cancer cell proliferation and antiestrogen resistance*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(12): p. 5157 -71.
281. Castro-Rivera, E., I. Samudio, and S. Safe, *Estrogen regulation of cyclin D1 gene expression in ZR-75 breast cancer cells involves multiple enhancer elements*. J Biol Chem, 2001. **276**(33): p. 30853 -61.
282. Amrani, Y., A.L. Lazaar, and R.A. Panettieri, *Up-regulation of ICAM-1 by cytokines in human tracheal smooth muscle cells involves an NF- κ B-dependent signaling pathway that is only partially sensitive to dexamethasone*. The Journal of Immunology, 1999. **163**(4): p. 2128 -2134.
283. Webster, J.C., et al., *Dexamethasone and tumor necrosis factor- α act together to induce the cellular inhibitor of apoptosis-2 gene and prevent apoptosis in a variety of cell types*. Endocrinology, 2002. **143**(10): p. 3866 -3874.
284. Colo, G.P., et al., *RAC3 down-regulation sensitizes human chronic myeloid leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis*. FEBS Lett, 2007. **581**(26): p. 5075 -81.
285. Gehr, G., et al., *Both tumor necrosis factor receptor types mediate proliferative signals in human mononuclear cell activation*. The Journal of Immunology, 1992. **149**(3): p. 911 -917.
286. Grell, M., et al., *The type 1 receptor (CD120a) is the high -affinity receptor for soluble tumor necrosis factor*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(2): p. 570 -575.
287. Horiuchi, T., et al., *Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents*. Rheumatology, 2010. **49**(7): p. 1215 -1228.
288. Mukai, Y., et al., *Solution of the structure of the TNF-TNFR2 complex*. Science Signaling, 2010. **3**(148): p. ra83.

289. Micalizzi, D.S., S.M. Farabaugh, and H.L. Ford, *Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression*. Journal of mammary gland biology and neoplasia, 2010. **15**(2): p. 117-134.
290. Wellner, U., et al., *The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs*. Nature cell biology, 2009. **11**(12): p. 1487 -1495.
291. Cavallaro, U. and G. Christofori, *Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer*. Nature Reviews Cancer, 2004. **4**(2): p. 118 -132.
292. Hugo, H., et al., *Epithelial / mesenchymal and mesenchymal / epithelial transitions in carcinoma progression*. Journal of cellular physiology, 2007. **213**(2): p. 374 -383.
293. Talmadge, J.E. and I.J. Fidler, *AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective*. Cancer research, 2010. **70**(14): p. 5649 -5669.
294. Demicheli, R., et al., *The effects of surgery on tumor growth: a century of investigations*. Annals of oncology, 2008. **19**(11): p. 1821 -1828.
295. Barkan, D., J.E. Green, and A.F. Chambers, *Extracellular matrix: a gatekeeper in the transition from dormancy to metastatic growth*. European Journal of Cancer, 2010. **46**(7): p. 1 181-1188.
296. Teng, M.W., et al., *Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer*. Journal of leukocyte biology, 2008. **84**(4): p. 988 -993.
297. Peinado, H., S. Lavotshkin, and D. Lyden. *The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts*. in *Seminars in cancer biology*. 2011. Elsevier.
298. Liu, M.-Z., et al., *Overexpression of AIB1 in nasopharyngeal carcinomas correlates closely with advanced tumor stage*. American journal of clinical pathology, 2008. **129**(5) : p. 728-734.
299. Li, L.B., et al., *Proto-oncogene ACTR/AIB1 promotes cancer cell invasion by up-regulating specific matrix metalloproteinase expression*. Cancer letters, 2008. **261**(1): p. 64 -73.
300. Yan, J., et al., *Steroid receptor coactivator-3/AIB1 promotes cell migration and invasiveness through focal adhesion turnover and matrix metalloproteinase expression*. Cancer research, 2008. **68**(13): p. 5460 -5468.
301. Reiter, R., A. Wellstein, and A.T. Riegel, *An isoform of the coactivator AIB1 that increases hormone and growth factor sensitivity is overexpressed in breast cancer*. J Biol Chem, 2001. **276**(43): p. 39736 -41.
302. Kim, J.H., H. Li, and M.R. Stallcup, *CoCoA, a nuclear receptor coactivator which acts through an N-terminal activation domain of p160 coactivators*. Mol Cell, 2003. **12**(6): p. 1537 -49.
303. Chen, Y.H., J.H. Kim, and M.R. Stallcup, *GAC63, a GRIP1-dependent nuclear receptor coactivator*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(14): p. 5965 -72.
304. Long, W., et al., *SRC-3Delta4 mediates the interaction of EGFR with FAK to promote cell migration*. Mol Cell. **37**(3): p. 321 -32.
305. He, C. and D.J. Klionsky, *Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy*. Annual review of genetics, 2009. **43**: p. 67.
306. Brasier, A.R., et al., *Synergistic enhancers located within an acute phase responsive enhancer modulate glucocorticoid induction of angiotensinogen gene transcription*. Molecular Endocrinology, 1990. **4**(12): p. 1921 -1933.
307. Kimmelman, A.C., *The dynamic nature of autophagy in cancer*. Genes & development, 2011. **25**(19): p. 1999 -2010.
308. Wei, Y., et al., *JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy*. Molecular cell, 2008. **30**(6): p. 678 -688.
309. Itakura, E., et al., *Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG*. Molecular biology of the cell, 2008. **19**(12): p. 5360 -5372.
310. Ravikumar, B., et al., *Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures*. Nature cell biology, 2010. **12**(8): p. 747 -757.

311. Hayashi-Nishino, M., et al., *A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation*. Nature cell biology, 2009. **11**(12): p. 1433 -1437.
312. Hailey, D.W., et al., *Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation*. Cell, 2010. **141**(4): p. 656 -667.
313. Hanada, T., et al., *The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(52): p. 37298 -37302.
314. Sou, Y.-s., et al., *The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice*. Molecular biology of the cell, 2008. **19**(11): p. 4762 -4775.
315. Komatsu, M., et al., *Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice*. The Journal of cell biology, 2005. **169**(3): p. 425 -434.
316. Wissink, S., et al., *Distinct domains of the RelA NF- κ B subunit are required for negative cross-talk and direct interaction with the glucocorticoid receptor*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(35): p. 22278 -22284.
317. Berghe, W.V., et al., *Dissociated glucocorticoids with anti-inflammatory potential repress interleukin-6 gene expression by a nuclear factor- κ B-dependent mechanism*. Molecular pharmacology, 1999. **56**(4): p. 797 -806.
318. Lin, K.-I., J.M. Baraban, and R.R. Ratan, *Inhibition versus induction of apoptosis by proteasome inhibitors depends on concentration*. Cell Death & Differentiation, 1998. **5**(7).
319. Srivastava, P., *Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity*. Nature Reviews Immunology, 2002. **2**(3): p. 185 -194.
320. Reichardt, H.M., et al., *Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor*. The EMBO journal, 2001. **20**(24): p. 7168 -7173.
321. Kamada, Y., et al., *Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex*. The Journal of cell biology, 2000. **150**(6): p. 1507 -1513.
322. Hosokawa, N., et al., *Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1 ' Atg13 ' FIP200 complex required for autophagy*. Molecular biology of the cell, 2009. **20**(7): p. 1981 -1991.
323. Koren, I., E. Reem, and A. Kimchi, *DAP1, a novel substrate of mTOR, negatively regulates autophagy*. Current biology, 2010. **20**(12): p. 1093 -1098.
324. Hsu, P.P., et al., *The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling*. Science, 2011. **332**(6035): p. 1317 -1322.
325. Settembre, C., et al., *A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB*. The EMBO journal, 2012. **31**(5): p. 1095 -1108.
326. Pyo, J.-O., J. Nah, and Y.-K. Jung, *Molecules and their functions in autophagy*. Experimental & molecular medicine, 2012. **44**(2): p. 73 -80.
327. Heck, S., et al., *I κ B α independent downregulation of NF κ B activity by glucocorticoid receptor*. The EMBO journal, 1997. **16**(15): p. 4698 -4707.
328. De Bosscher, K., W. Vanden Berghe, and G. Haegeman, *Glucocorticoid repression of AP-1 is not mediated by competition for nuclear coactivators*. Molecular Endocrinology, 2001. **15**(2): p. 219 -227.
329. Tang, H., et al., *Amino acid-induced translation of TOP mRNAs is fully dependent on phosphatidylinositol 3-kinase-mediated signaling, is partially inhibited by rapamycin, and is independent of S6K1 and rpS6 phosphorylation*. Molecular and cellular biology, 2001. **21**(24): p. 8671 -8683.
330. Mayer, C., et al., *mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability*. Genes & development, 2004. **18**(4): p. 423 -434.
331. Kantidakis, T., et al., *mTOR associates with TFIIC, is found at tRNA and 5S rRNA genes, and targets their repressor Maf1*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(26): p. 11823 -11828.
332. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis*. Current biology, 2009. **19**(22): p. R1046-R1052.

333. Wang, B.T., et al., *The mammalian target of rapamycin regulates cholesterol biosynthetic gene expression and exhibits a rapamycin-resistant transcriptional profile*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(37): p. 15201 -15206.
334. Kim, J.E. and J. Chen, *Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis*. Diabetes, 2004. **53**(11): p. 2748 -2756.
335. Hudson, C.C., et al., *Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression and function by the mammalian target of rapamycin*. Molecular and cellular biology, 2002. **22**(20): p. 7004 -7014.
336. Cunningham, J.T., et al., *mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 α transcriptional complex*. Nature, 2007. **450**(7170): p. 736 -740.
337. Lee, D.-F., et al., *IKK β suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway*. Cell, 2007. **130**(3): p. 440 -455.
338. Prasad, S., J. Ravindran, and B.B. Aggarwal, *NF- κ B and cancer: how intimate is this relationship*. Molecular and cellular biochemistry, 2010. **336**(1-2): p. 25 -37.
339. Hara, K., et al., *Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(23): p. 14484 -14494.
340. DeYoung, M.P., et al., *Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling*. Genes & development, 2008. **22**(2): p. 239-251.
341. Budanov, A.V. and M. Karin, *p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling*. Cell, 2008. **134**(3): p. 451 -460.
342. Feng, Z., et al., *The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(23): p. 8204 -8209.
343. Dowling, R.J., et al., *mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs*. Science, 2010. **328**(5982): p. 1172 -1176.
344. Hsieh, A.C., et al., *Genetic dissection of the oncogenic mTOR pathway reveals druggable addiction to translational control via 4EBP-eIF4E*. Cancer Cell, 2010. **17**(3): p. 249 -261.
345. Menendez, J.A. and R. Lupu, *Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis*. Nature Reviews Cancer, 2007. **7**(10): p. 763 -777.
346. Düvel, K., et al., *Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1*. Molecular cell, 2010. **39**(2): p. 171 -183.
347. Torres-Arzuayus, M.I., et al., *Targeting the AIB1 oncogene through mammalian target of rapamycin inhibition in the mammary gland*. Cancer research, 2006. **66**(23): p. 11381 -11388.
348. Semenza, G.L., *Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1*. Annual review of cell and developmental biology, 1999. **15**(1): p. 551 -578.
349. Semenza, G.L., *HIF-1, O₂, and the 3 PHDs: How Animal Cells Signal Hypoxia to the Nucleus*. Cell, 2001. **107**(1): p. 1 -3.
350. Semenza, G.L., *Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics*. Oncogene, 2010. **29**(5): p. 625 -634.
351. Cairns, R.A., T. Kalliomaki, and R.P. Hill, *Acute (cyclic) hypoxia enhances spontaneous metastasis of KHT murine tumors*. Cancer research, 2001. **61**(24): p. 8903 -8908.
352. Peng, Y.J., et al., *Heterozygous HIF-1 α deficiency impairs carotid body-mediated systemic responses and reactive oxygen species generation in mice exposed to intermittent hypoxia*. The Journal of physiology, 2006. **577**(2): p. 705 -716.
353. Maxwell, P.H. *The HIF pathway in cancer*. in *Seminars in cell & developmental biology*. 2005. Elsevier.
354. Forsythe, J.A., et al., *Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1*. Molecular and cellular biology, 1996. **16**(9): p. 4604-4613.

355. Liang, X., et al., *Hypoxia-inducible factor-1 alpha, in association with TWIST2 and SNIP1, is a critical prognostic factor in patients with tongue squamous cell carcinoma*. Oral oncology, 2011. **47**(2): p. 92 -97.
356. Jiang, J., Y.-l. Tang, and X.-h. Liang, *A new vision of hypoxia promoting cancer progression*. Cancer biology & therapy, 2011. **11**(8): p. 714 -723.
357. Denko, N.C., *Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour*. Nature Reviews Cancer, 2008. **8**(9): p. 705-713.
358. Taylor, C.T. and E.P. Cummins, *The Role of NF- κ B in Hypoxia-Induced Gene Expression*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2009. **1177**(1): p. 178 -184.
359. Rius, J., et al., *NF- κ B links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1 α* . Nature, 2008. **453**(7196): p. 807 -811.
360. Fitzpatrick, S.F., et al., *An intact canonical NF- κ B pathway is required for inflammatory gene expression in response to hypoxia*. The Journal of Immunology, 2011. **186**(2): p. 1091 -1096.
361. Fernandez Larrosa, P.N., et al., *Nuclear receptor coactivator RAC3 inhibits autophagy*. Cancer Science. **103**(12): p. 2064 -2071.
362. Colo, G.P., et al., *[RAC3 nuclear receptor co-activator has a protective role in the apoptosis induced by different stimuli]*. Medicina (B Aires), 2007. **67**(5): p. 465 -8.
363. Bimboim, H. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic acids research, 1979. **7**(6): p. 1513 -1523.
364. Biederick, A., H. Kern, and H. Elsässer, *Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles*. European journal of cell biology, 1995. **66**(1): p. 3 -14.
365. Bjørkøy, G., et al., *Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1*. Methods in enzymology, 2009. **452**: p. 181-197.
366. Wells, J. and P.J. Farnham, *Characterizing transcription factor binding sites using formaldehyde crosslinking and immunoprecipitation*. Methods, 2002. **26**(1): p. 48 -56.
367. Yu, C., et al., *An essential function of the SRC-3 coactivator in suppression of cytokine mRNA translation and inflammatory response*. Molecular cell, 2007. **25**(5): p. 765 -778.
368. Saito, M. and S. Watanabe, *Differential modulation of lipopolysaccharide-and zymosan-induced hypophagia by dexamethasone treatment*. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2008. **90**(3): p. 428 -433.
369. Almawi, W., et al., *Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids*. Journal of leukocyte biology, 1996. **60**(5): p. 563 -572.
370. Besedovsky, H., et al., *Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones*. Science, 1986. **233**(4764): p. 652 -654.
371. Refojo, D., et al., *Transcription factor-mediated molecular mechanisms involved in the functional cross-talk between cytokines and glucocorticoids*. Immunology and cell biology, 2001. **79**(4): p. 385 -394.
372. Smoak, K.A. and J.A. Cidlowski, *Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation*. Mechanisms of ageing and development, 2004. **125**(10): p. 697 -706.
373. De Bosscher, K., W.V. Berghe, and G. Haegeman, *The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor- κ B or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression*. Endocrine reviews, 2003. **24**(4): p. 488-522.
374. Webster, J.C. and J.A. Cidlowski, *Mechanisms of glucocorticoid-receptor-mediated repression of gene expression*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 1999. **10**(10): p. 396 -402.
375. Baeuerle, P.A. and V.R. BAICHWAL, *NF-KB as a Frequent Target for Immunosuppressive and Anti-Inflammatory Molecules*. Advances in immunology, 1997. **65**: p. 111.
376. Beyaert, R., et al., *The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor*. The EMBO journal, 1996. **15**(8): p. 1914.

377. Bode, J.G., et al., *The mitogen-activated protein (MAP) kinase p38 and its upstream activator MAP kinase kinase 6 are involved in the activation of signal transducer and activator of transcription by hyperosmolarity*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(42): p. 30222 -30227.
378. Franco, D.L., et al., *Osmotic stress sensitizes naturally resistant cells to TNF-alpha-induced apoptosis*. Cell Death Differ, 2002. **9**(10): p. 1090 -8.
379. Hapgood, J.P., J. Riedemann, and S.D. Scherer, *REGULATION OF GENE EXPRESSION BY GC-RICH DNA CIS-ELEMENTS*. Cell biology international, 2001. **25**(1): p. 17 -31.
380. Jukes, T.H. and M. Kimura, *Evolutionary constraints and the neutral theory*. Journal of molecular evolution, 1984. **21**(1): p. 90 -92.
381. Lonard, D.M. and B.W. O'Malley, *Nuclear receptor coregulators: judges, juries, and executioners of cellular regulation*. Molecular cell, 2007. **27**(5): p. 691 -700.
382. Easton, J.B. and P.J. Houghton, *mTOR and cancer therapy*. Oncogene, 2006. **25**(48): p. 6436 -46.
383. Hay, N. and N. Sonenberg, *Upstream and downstream of mTOR*. Genes & development, 2004. **18**(16): p. 1926 -1945.
384. Lydon, J.P. and B.W. O'Malley, *Minireview: steroid receptor coactivator-3: a multifarious coregulator in mammary gland metastasis*. Endocrinology, 2011. **152**(1): p. 19 -25.
385. Trocoli, A. and M. Djavaheri-Mergny, *The complex interplay between autophagy and NF-kB signaling pathways in cancer cells*. American journal of cancer research, 2011. **1**(5): p. 629.
386. Mathew, R., V. Karantza-Wadsworth, and E. White, *Assessing metabolic stress and autophagy status in epithelial tumors*. Methods in enzymology, 2009. **453**: p. 53-81.
387. Torchia, J., et al., *The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function*. Nature, 1997. **387**(6634): p. 677 -684.
388. Beutler, B., et al., *Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance*. Science, 1986. **232**(4753): p. 977 -980.
389. Rao, N.A., et al., *Coactivation of GR and NFKB alters the repertoire of their binding sites and target genes*. Genome research, 2011. **21**(9): p. 1404 -1416.
390. Busillo, J.M., K.M. Azzam, and J.A. Cidlowski, *Glucocorticoids sensitize the innate immune system through regulation of the NLRP3 inflammasome*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(44): p. 38703 -38713.
391. Ding, Y., et al., *Dexamethasone enhances ATP-induced inflammatory responses in endothelial cells*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2010. **335**(3): p. 693 -702.
392. Narita, M., A. Young, and M. Narita, *Autophagy facilitates oncogene-induced senescence*. Autophagy, 2009. **5**(7): p. 1046-1047.
393. Moscat, J. and M.T. Diaz-Meco, *p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer*. Cell, 2009. **137**(6): p. 1001-1004.
394. Xiao, G., *Autophagy and NF-kB: Fight for fate*. Cytokine & growth factor reviews, 2007. **18**(3): p. 233 -243.